

PERSENTASE JENIS LEUKOSIT PADA MENCIT SETELAH DIINFEKSI *Plasmodium berghei* DAN DIBERI FRAKSI ETIL ASETAT CENGKEH VARIETAS AFO

PERCENTAGE OF LEUKOCYTES TYPE IN MICE AFTER INFECTED WITH *Plasmodium berghei* AND GIVEN AN ETHYL ACETATE FRACTION OF AFO VARIETIES

Umi Cahyaningsih¹, Dharmawaty M Taher², Rizal Gusdinar¹

¹Laboratorium Protozoologi, Divisi Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

²Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Khairun Ternate

Naskah diterima tanggal 9 Desember 2019

ABSTRACT

Abstract merupakan Leukocytes consist of lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and basophils which are white blood cells that function as one of the body's defense systems. The existence of *Plasmodium* can interfere with the body's defenses. Malaria in mice is caused by *Plasmodium berghei* which can be used as a model for malaria research in humans. At present the *Artemisia annua* plant is antimalarial but has begun to become resistant. Therefore it is necessary to find alternative substitutes for antimalarial drugs. Afo clove variety is the oldest clove in the world found in North Maluku, *in vitro* can inhibit the growth of *Plasmodium*. The purpose of this study was to determine the percentage of leukocytes in mice infected with *P. berghei* and given the afo variety clove fraction. This study used 25 mice (*Mus musculus*) infected with *P. berghei* 1×10^6 and divided into 5 treatment groups, namely 1) negative control (not treated), 2) positive control (given Piperaquine), 3) group P25 (given a dose fraction of 25 mg / kg body weight), 4) group P50 (dose 50 mg / kg body weight), and 5) group P100 (dose 100 mg / kg body weight). Mice were given an ethyl acetate fraction of afo varieties for four days and given 24 hours after the mice were infected with *P. berghei*. Blood is taken at the tip of the tail of mice every 24 hours from day 0 to day 7. Blood curing preparations are made using Giemsa staining, then examined using a microscope with magnification 1000 times to calculate the percentage of types of leukocytes. The results of this study showed that on days 4 and 5 after infection, treatment of P50 and P100 decreased the percentage of neutrophils because the clove fraction contained karyofilen which could inhibit the growth of *Plasmodium*. Percentage lymphocytes increased in the P50 and P100 treatments due to this clove fraction contains flavonoids which can increase lymphocyte proliferation. The administration of the afo variety clove ethyl acetate fraction affected the neutrophil, lymphocyte and monocyte percentage values in mice infected with *P. berghei*.

Keywords : Leukocytes, afo clove fraction, *P. berghei*

ABSTRAK

Leukosit terdiri dari limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil dan basofil yang merupakan sel darah putih berfungsi sebagai salah satu sistem pertahanan tubuh. Adanya *Plasmodium* dapat mengganggu pertahanan tubuh. Malaria pada mencit disebabkan oleh *Plasmodium berghei* yang dapat digunakan sebagai model untuk penelitian malaria pada manusia. Saat ini tanaman *Artemisia annua* sebagai antimalaria tetapi sudah mulai resisten. Oleh karena itu perlu mencari alternative pengganti untuk obat antimalaria. Cengkeh varietas afo merupakan cengkeh tertua di dunia terdapat di Maluku Utara, secara *in vitro* dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui persentase jenis leukosit pada mencit yang diinfeksi *P. berghei* dan diberi fraksi cengkeh varietas afo. Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi dengan *P. berghei* 1×10^6 dan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu 1) kontrol negatif (tidak diobati), 2) kontrol positif (diberi Pi-peraquine), 3) kelompok P25 (diberi fraksi dosis 25 mg/kg BB), 4) kelompok P50 (dosis 50 mg/kg BB), dan 5) kelompok P100 (dosis 100 mg/kg BB). Mencit diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo selama empat hari dan diberikan 24 jam setelah mencit diinfeksi *P. berghei*. Darah diambil pada bagian ujung ekor mencit setiap 24 jam sejak hari ke 0 sampai hari ke 7. Preparat ulas darah di-buat menggunakan pewarnaan Giemsa, kemudian diperiksa menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali untuk menghitung persentase jenis leukosit. Hasil penelitian ini menunjukkan pada hari ke 4 dan ke 5 setelah infeksi, perlakuan P50 dan P100 terjadi penurunan persentase neutrophil karena fraksi cengkeh mengandung karyofilen yang dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium*. Persentase limfosit meningkat pada perlakuan P50 dan P100 karena fraksi cengkeh ini mengandung flavonoid yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Pemberian fraksi etil asetat cengkeh varietas afo mempengaruhi nilai persentase neutrophil, limfosit dan monosit pada mencit yang diinfeksi *P. berghei*.

Kata Kunci : Leukosit, fraksi cengkeh afo, *P. berghei*

Alamat korespondensi :

umicahyaningsih@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Leukosit merupakan salah satu dari sistem pertahanan tubuh terhadap serangan agen penyakit melalui fagositosis dan menghasilkan antibodi (Purnomo *et al.* 2015). Leukosit dibagi menjadi dua golongan yaitu agranular (limfosit dan monosit) dan granular (neutrofil, basofil, dan eosinofil). Limfosit merupakan unsur penting dalam sistem kekebalan (Yalcinkaya *et al.* 2008). Monosit bersama dengan sel neutrofil dan berperan sebagai pertahanan kedua ketika adanya peradangan (Lokapirnasari dan Yulianto 2014). Eosinofil berperan terhadap alergi dan perbarahan (Purnomo *et al.* 2015). Peranan basofil dalam respon kekebalan tubuh diawali sejak kontak dengan substansi penyebab alergi dan menghasilkan bahan mediator kimiawi yang selanjutnya menarik sel-sel imun lainnya (Moireira 2013).

Plasmodium berghei merupakan spesies dari genus *Plasmodium* yang menginfeksi sel darah mencit dan dapat digunakan sebagai model untuk penelitian malaria. (Basir *et al.*, 2012). *Plasmodium berghei* yang menginfeksi mencit memiliki kemiripan dengan *P. falciparum* secara morfologi, siklus hidup, dan genetika, sehingga sering dijadikan model penelitian obat antimalaria (Karolina 2015).

Saat ini *Plasmodium* sudah mulai resistan terhadap obat anti malaria klorokuin dan artemisinin (Noedl 2009, Raini 2011). Oleh karena itu perlu mencari tanaman sebagai obat anti malaria yaitu cengkeh. Cengkeh varietas afo merupakan jenis cengkeh tertua di dunia dan termasuk salah satu varietas unggul. Fraksinasi yang dilakukan terhadap ekstrak methanol cengkeh menunjukkan efek yang baik sebagai antimalaria (Taher 2019).

METODE PENELITIAN

Persetujuan Penelitian Dari Komisi Etik Hewan

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan IPB (SKEH) nomor: 060/KEH/SKE/V/2017 tanggal 3 Mei 2017.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microtube*, gelas ukur, mortar, sonde lambung, *glove*, masker, mikrohematokrit tabung kapiler), mikroskop, mortar, *tissue*, *syringe* 1 ml, kertas saring, gelas objek, kandang mencit, tempat minum, sekam padi, timbangan digital, dan lemari pendingin.

Bahan

Tanaman yang digunakan sebagai bahan penelitian adalah cengkeh varietas afo, dari Kota Ternate Provinsi Maluku Utara. Tangkai bunga cengkeh dipilih kemudian dihaluskan sampai berukuran kurang lebih 60 mesh. Ekstraksi

sampel cengkeh dilakukan dengan teknik mase-rasi (merendam) dengan pelarut metanol 70%. Fraksinasi dilakukan dengan teknik kromatografi cair vakum (KCV). Etil asetat 70% digunakan sebagai eluen (pelarut). Fraksi etil asetat cengkeh varietas afo dicampurkan dengan larutan *Carboxy methyl cellulose natrium* (CMC Na) sebanyak 0.2 mL.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan dari galur Deustch Democratic Yokohama (DDY) berumur 2 bulan dengan berat badan antara 20 – 30 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB.

Metode

1. Perlakuan hewan untuk uji *in vivo*

Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit. Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 9 hari, diberi obat cacing, antibiotik, dan anti-protozoal sebelum diinfeksi. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Pembagian kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (KN) yang diinfeksi *P. berghei*, kontrol positif (KP) yang diinfeksi *P. berghei* dan diberi obat antimalaria *Piperaquine*, kelompok perlakuan P25, mencit diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo dosis 25 mg/kg bobot badan (BB), kelompok perlakuan P50, mencit diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo dosis 50 mg/kg BB, kelompok perlakuan P100, mencit diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo dosis 100 mg/kg BB. *P.berghei* yang diinfeksi pada mencit dengan dosis 1×10^6 *P. berghei* setiap ekor mencit. Pemberian fraksi cengkeh secara oral satu kali sehari, dimulai 24 jam setelah mencit diinfeksi *P.berghei* dan diberikan selama empat hari berturut-turut.

2. Pembuatan Preparat Ulas Darah

Pembuatan ulas darah diambil melalui vena *coccigea* pada bagian ujung ekor mencit, dilakukan ulas darah setiap hari. Preparat ulas darah dibuat dengan cara satu tetes darah ditetaskan keatas objek gelas, kemudian diulas dengan gelas objek lain membentuk sudut 45°. Preparat difiksasi dengan methanol selama tiga sampai lima menit dan dikeringkan, lalu diwarnai dengan Giemsa 10% selama 30 menit. Preparat ulas darah kemudian dibilas dengan air mengalir kemudian dibiarkan hingga kering.

3. Perhitungan Diferensial Leukosit

Perhitungan diferensial leukosit dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Pengamatan dibawah mikroskop ditambahkan minyak emersi untuk memperjelas pengamatan. Setiap 100 leukosit yang ditemukan dihitung dan dikelompokkan kedalam masing-masing jenis leukosit, yaitu neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit, dan monosit. Nilai relatif setiap jenis leukosit dinyatakan dalam satuan persen. Nilai relatif diperoleh dengan menggunakan rumus (Svobo-

dova dan Vykusova 1991), yaitu:

$$\text{Nilai relatif} = \frac{\sum \text{Jenis leukosit}}{100} \times 100\%$$

Analisis Data

Data rata-rata persentase diferensial leukosit diolah dengan uji *Analysis of Varian* (ANOVA). Perbedaan masing-masing kelompok perlakuan di uji dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Neutrofil

Persentase neutrophil pada perlakuan P25 dan P50 pada hari ke-1 sampai ke-3 setelah infeksi dan diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan P100 (Gambar 1). Pada hari ke 7, perlakuan P25 menunjukkan persentase neutrofil yang paling rendah. Rendahnya persentase neutrophil berhubungan dengan kejadian parasitemia. Neutrofil akan melakukan fagositosis terhadap benda asing (parasit), selain itu neutrofil juga menghasilkan enzim lisozim untuk menghancurkan parasit (Tizard 2013).

Persentase neutrofil P50 dan P100 hari ke-4 sampai ke-5 lebih rendah dibandingkan dengan hari ke-1. Persentase neutrofil P100 hari ke-4 sampai ke-7 lebih rendah dibandingkan dengan hari ke-1. Penurunan persentase neutrophil berhubungan dengan parasitemia. Kejadian tersebut diduga karena fungsi neutrofil yang hanya berperan sebagai bentuk pertahanan awal untuk memfagosit benda asing (parasit), kemudian mengalami auto lisis setelah proses fagositosis selesai (Chuang *et al.* 2007; Intanet *et al.* 2016).

Persentase parasitemia pada mencit yang diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif, hal ini disebabkan fraksi etil asetat cengkeh varietas afo memiliki kandungan karyofilen (Taher 2019). Karyofilen merupakan senyawa yang

mampu menghambat perkembangan *P.berghei* (Sibiya *et al.*2016). Karyofolen di duga mampu menghambat perkembangan parasite-mia pada fase ekstra eritrositik pada sel hati (Taher 2019).

Eosinofil

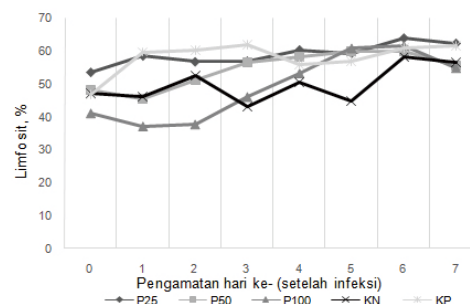
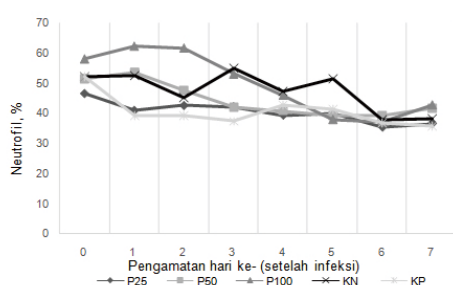
Eosinofil merupakan bentuk pertahanan terhadap infeksi parasite seperti cacing dan protozoa tertentu (*Isospora belli*, *Dientamoeba fragilis*, dan *Sarcocystis sp.*) (Mehta dan Hoffbrand 2006; Kovalszki dan Weller 2016). Nilai persentase eosinophil semua perlakuan berada pada taraf normal. Taraf normal eosinophil yaitu 0-4% (Malole dan Pramono1989). Persentase eosinofil yang berada pada taraf normal menunjukkan infeksi *P.berghei* dan pemberian fraksi etil asetat cengkeh varietas afo tidak memengaruhi eosinofil.

Basofil

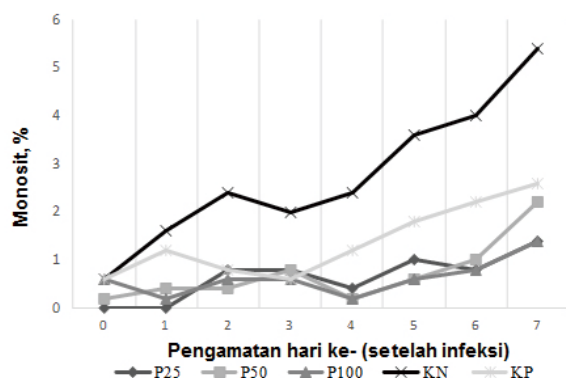
Hasil pengamatan ulas darah yang dilakukan pada mencit setelah diinfeksi *P. berghei* dan diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo tidak ditemukan adanya basofil. Hasil tersebut membuat persentase basofil pada P25, P50, dan P100 tidak berbeda nyata dengan KN dan KP ($p \geq 0.05$). Menurut Colville dan Bassert (2002), basophil sulit ditemukan dalam darah pada keadaan normal. Basofil merupakan sel leukosit yang akan berperan aktif dalam reaksi hipersensitivitas dan alergi (Sokol *et al.* 2009). Basofil akan merangsang reaksi hipersensitivitas dengan membebaskan histamin dan heparin. (Soma *et al.* 2013).

Limfosit

Persentase limfosit pada perlakuan P25 dan P50 pada hari ke-1 sampai ke-3 setelah infeksi dan diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan P100 (Gambar 2). Persentase limfosit P50 dan P100 hari ke-3 sampai ke-7 lebih tinggi dibandingkan dengan hari ke-1. Persentase limfosit pada perlakuan P50 dan P100 mengalami peningkatan, hal itu dipengaruhi oleh pemberian fraksi etil asetat cengkeh varietas afo. Menurut Taher (2019), fraksi etil asetat cengkeh varietas afo mengandung flavonoid. Kandungan flavonoid



Gambar 1. Grafik rata-rata persentase neutrofil P25, P50, P100, KN, dan KP
Gambar 2. Grafik rata-rata persentase limfosit P25, P50, P100, KN, dan KP



Gambar 3. Grafik rata-rata persentase Monosit P25, P50, P100, KN, dan KP

dapat meningkatkan proliferasi limfosit (Nugroho 2012), sehingga pembentukan limfosit lebih baik. Flavonoid juga dapat berperan dalam meningkatkan aktivitas interleukin-2 (IL-2) (Parlinaningrum 2014) sehingga dapat merangsang sel T sitotoksik untuk menghancurkan benda asing (parasit).

Monosit

Pada hari ke-1 menunjukkan persentase monosit pada perlakuan P25, P50 dan P100 lebih rendah dibandingkan dengan KP. Persentase monosit P50 hari ke-7 lebih tinggi dibandingkan dengan hari lainnya. Persentase P25, P50, dan P100 pada hari ke-1, ke-2, ke-4 sampai ke-7 lebih rendah dibandingkan dengan KN. Persentase monosit perlakuan P50 mengalami peningkatan pada akhir pengamatan. Menurut Themlet *et al.* (2004), monosit merupakan bentuk pertahanan kedua dari sel leukosit setelah neutrophil terhadap serangan parasit. Peningkatan persentase monosit dapat dipicu oleh senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat cengkeh varietas afo. Menurut Fatimatuazzahroh *et al.* (2015), flavonoid dapat meningkatkan reaksi inang dalam mengaktivasi pembentukan monosit. Nilai persentase monosit pada perlakuan KN melebihi taraf normal pada hari ke-5 sampai ke-7.

Nilai persentase monosit normal berada pada rentang 0-3.5% (Malole dan Pra-mono 1989). Nilai persentase monosit yang melebihi taraf normal pada KN disebabkan tingginya nilai persentase parasitemia dalam darah (Taher 2019). Nilai persentase parasitemia pada mencit yang diberi fraksi etil asetat cengkeh varietas afo lebih rendah dibandingkan dengan KN (Taher *et al.* 2019), sehingga nilai persentase monositnya lebih rendah.

KESIMPULAN

Pemberian fraksi etil asetat cengkeh varietas afo memengaruhi persentase neutrophil, limfosit dan monosit pada mencit

yang diinfeksi *P. berghei* tetapi tidak mempengaruhi persentase basofil dan eosinofil.

DAFTAR PUSTAKA

- Basir R. FazalulRahiman SS. Hasballah K. Chong WC. Talib H. Yam F. Jabbarzate M. Tie TH. Othman F. Moklis MAM. Ab-dullah WO. Ahmad Z. 2012. *Plasmodium berghei*. ANKA infection in ICR mice as a model of cerebral malaria. *Iran J Parasitol* 7(4), 62-74
- Chuang MT, Lin YS, Hau WC. 2007. Acoriding the major rhizome protein of madeira-vine, with trypsin inhibitory and stimulatory activities in nitric oxide productions. *Pep-tides* 28(1), 1311-1316
- Colville T, Bassert JM. 2016. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*. Ed ke-3. Philadelphia (US): Mosby.
- Fatimatuazzahroh, Firani K, Kristianto H. 2015. Efektivitas ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap jumlah pembu-luh darah kapiler pada proses penyem-buhan luka insisi fase proliferasi. *Majalah Kesehatan Fakultas Kedokteran Univer-sitas Brawijaya* 2(2), 92-98
- Intan PR, Winarno MW, Prihartini N. 2016. Efek ekstrak campuran kulit batang pulai (*Alstoniascholaris*) dan meniran (*Pyilanthus-niruri*) pada mencit *Swiss webster* yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Jurnal Ke-farmasian Indonesia* 6(2), 79-88
- Karolina ME. 2015. Pengaruh pemberian ekstrak *Annona muricata* terhadap kadar nitric oxide pada mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. *Jurnal Pene-litian Universitas Jambi Seri Sains* 17(2), 86-91
- Kovalszki A dan Weller PF. 2016. Eosinophilia. *Primary care* 43(4), 607-617
- Lokapirnasari WP, Yulianto AB. 2014. Gambar-an Sel Eosinofil, Monosit, dan Basofil Setelah Pemberian Spirulina pada Ayam yang Diinfeksi Virus Flu Burung. *Jurnal Veteriner Indonesia* 15(4), 499-505
- Malole MBM, Pramono CSU. 1989. *Pengguna-an hewan-hewan percobaan di laborato-rium*. Bogor (ID): IPB.
- Mehta AB dan Hooffbrand VA. 2014. *Hemato-logy at a Glance*. Ed ke-4. West Sussex (UK): John Wiley & Sons Ltd.
- Moreira LM, Behling B del S, Rodrigues R da S, Costa JAV, Soares LA de Souza. 2013. Spirulina as a protein source in the nutritional recovery of Wistar rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56: 3.
- Noedl H. Socheat D. Satimai W. 2009. Artemi-sinin-Resistant malaria in Asia. *N Engl J*

361(5), 540-541

- Parlinaningrum D, Widyarti S, Rifa'i M. 2014. Pengaruh pemberian ekstrak etanol *Anno-na muricata* Linn. Terhadap peningkatan jumlah B220 pada *Mus musculus*. *Jurnal Biotropika* 2(5), 269-272
- Purnomo D, Sugiharto, Isroli. 2015. Total leu-kosit dan diferensial leukosit darah ayam broiler akibat penggunaan tepung onggok fermentasi *rhizopus oryzae* pada ransum. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 25(3), 59-68
- Raini M. Gitawati R. Isnawati A. Tjitra E. 2011. Keluhan dan Kepatuhan Penderita malaria Terhadap Pengobatan Malaria Artesunat-Amodiakuin di Kalimantan dan Sulawesi. *Media Penelitian dan Pengembangan Ke-sehatan* 21(3), 111-118
- Sibiya HP, Mabandla MV, Musabayane CT. 2016. The effects of transdermally delivered oleanolic acid on malaria parasites and blood glucose homeostasis in *P. berghei* infected male Sprague-dawley rats. *Plos One* 11(12), 1-18
- Sokol LC, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitoy R. 2009. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nature Immunology* 10 (7), 713-720
- Soma IG, Wandalia IN, Putra IG, Silta R. 2013. Profil darah monyet ekor panjang (*Maca-cafascicularis*) liar di habitat alami. *Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan* 1 (1) 22-28
- Svobodova Z dan Vykusova B. 1991. *Diagnostics, prevention and therapy of fish diseases and intoxications*. Czechoslovakia (CZK): Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany.
- Taher DM. 2019. Pengujian antimalaria menggunakan tanaman cengkeh (*Syzigium aromaticum*[L.] Merry & Perry) (studi *in vitro*, *in vivo*, toksisitas, dan *screening* senyawa aktif) [disertasi]. Bogor (ID): IPB
- Theml H, Diem H, Haferlach T. 2004. *Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis Second Edition*. New York (AS): Thieme Clinical Science
- Tizard I. 2013. *Veterinary Immunology*. Ed ke-9. Saint Louis (USA): Elsevier.
- Yalcinkaya, L., T. M. Gonggor, Basalan and E. Erdem. 2008. Mannan oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in broilers: Effects on performance and blood biochemistry. *Turkey Journal Veterinary Animal Science* 32 (1), 43-48