

**EFEK IMUNOSTIMULATORI BEBERAPA FRAKSI TERIPANG LOKAL
Phyllophorus sp TERHADAP HISTOLOGI LIMPA MENCIT
(*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Mycobacterium tuberculosis***

Dwi Winarni, Cipto Dwi Handono dan, Sugiharto

Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

*This research was aimed to know the immunostimulator potential of *Phylloporus sp.*'s extract and fraction as response of *Mycobaterium tuberculosis* infection and fraction has the highest potential of immunostimulator based on histological changes in germinal center's diameter of *Mus musculus*. This research used 60 male mices (*Mus musculus*) strain BALB/C, age 3-4 months, 30-40 g, then divided into 4 groups of control and 6 groups of treatment. Negative control group (KN), positive control group (KP), polar fraction group (FP), semi-polar fraction group (FS), and non-polar fraction group (FN), then respectively divided into two group based on the day of sacrifice. KN 17, KP 17, FP 17, FS 17, and FN 17 sacrificed on day 17 with once injection of *M. tuberculosis* on day 14. KN 28, KP 28, FP 28, FS 28, and FN 28 sacrificed on day 28 with the second injection on day 18. KN 17 and KN 28 was only given solvent and was not injected with *M. tuberculosis*. Solvents were used in the fractionation stage of *Phylloporus sp.* for each group, polar group, semi-polar group, and non-polar group sequentially are n-hexane, ethyl acetate, and ethanol. The observation of germinal center's diameter used light microscope on 400x magnification by taking 5 germinal center on one slide of spleen with 6 slices each. Germinal center's diameter was the average of the longest and the shortest diameter from measurement. Data was then analyzed using ANOVA and Duncan test $\alpha = 0,05$. The average of germinal center diameter from each group are KN17 = 58,7 μm , KP17=58,3 μm , FP17=73,1 μm , FS17=76,9 μm , FN17=103,5 μm , KN28=57,4 μm , KP28=58,6 μm , FP28=71,2 μm , FS28=70,7 μm , and FN28=90,7 μm with p value of ANOVA=0,00. Based on the result, the negative control group has no difference with the positive one, but the positive control group are different if we compare it with the treatment group. This result indicated that the extract of *Phylloporus sp* has the potential to be immunostimulator and the fraction which has the highest potency is non-polar fraction.*

Key word : *Phylloporus sp.* *Mycobacterium tuberculosis*, diameter of germinal center, polar, semi-polar and nonpolar fraction

Pengantar

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Kim *et al.*, 2009). Tuberkulosis pada umumnya terjadi di paru-paru tetapi kadang-kadang dapat juga mempengaruhi organ tubuh lainnya, termasuk kulit, tulang, kelenjar getah bening, hati, saluran pencernaan dan

sistem saraf pusat (otak dan sumsum tulang belakang). Bakteri ini berbentuk batang, mempunyai sifat khusus yaitu tahan terhadap pewarnaan asam, oleh karena itu disebut pula sebagai Basil Tahan Asam (BTA), bakteri tuberkulosis cepat mati dengan sinar matahari langsung, tetapi dapat bertahan hidup beberapa jam ditempat yang gelap dan lembab. Dalam jaringan tubuh bakteri ini

dapat dorman, selama beberapa tahun (Anonimus, 2006a).

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri patogen yang memiliki kemampuan hidup dan berkembang biak di dalam makrofag. Setelah mampu melewati pertahanan mekanik di saluran nafas, *M. tuberculosis* akan menuju alveoli. Dalam jaringan alveoli, *M. tuberculosis* akan difagosit oleh makrofag alveoli (*alveolar macrophage*). Makrofag merupakan kunci utama dalam proses eliminasi *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* dapat bertahan dan membelah diri dalam makrofag yang belum teraktivasi, tetapi bila makrofag telah teraktivasi maka sel ini dapat menghambat *M. tuberculosis* yang telah difagosit. Sebagian besar *M. tuberculosis* dibunuh oleh makrofag. Pada sebagian orang, bakteri ini dapat bertahan sehingga dapat menyebabkan terjadinya infeksi TB yang aktif (Schluger, 2001).

Proses fagositosis merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh alami (sistem imun non spesifik) terhadap benda asing atau antigen, termasuk mikroorganisme (Baratawidjaya, 2006). Di dalam tubuh terdapat dua kelompok fagosit, yaitu fagosit polimorfonuklear (netrofil) dan fagosit mononuklear (terdiri dari keluarga monosit dan makrofag). Netrofil dan makrofag berperan sebagai efektor selular dalam respons imun non spesifik (Subowo, 2009).

Sistem non spesifik berperan sebagai sensor, memaparkan antigen dan menstimulasi sistem imun spesifik. Fungsi tersebut sangat tergantung pada peran dari *pattern recognition receptor*. Salah satu dari bagian PRR yaitu *signaling receptor* (*signaling PRR*) meliputi protein trans-membran dan protein sitosolik. *Signaling PRR* trans-membran dikenal dengan TLR (*toll-like receptor*) yang terdiri dari komponen ekstra seluler yang kaya leusin (terdiri dari 550 sampai asam amino dan berkapasitas mengikatkan ligan) dan komponen intraseluler (yang dikenal sebagai TIR (*Toll/IL-IR-like*) dengan

panjang sekitar 200 asam amino, berfungsi meneruskan sinyal untuk proses selanjutnya) (Akira dan Kaisho, 2001).

Salah satu organ yang bertanggung jawab terhadap pertahanan tubuh yaitu limpa. Limpa merupakan salah satu bagian dari jaringan limfoid (Anonimus, 2011b). Dalam limpa terdapat struktur *germinal center* yang merupakan tempat berkumpulnya limfosit B. Pada jaringan limfoid sekunder, limfosit mengenali fragmen antigen *non-self* yang mempresentasikan sel makrofag, sel dendrik, sel fagosit (Subowo, 2009). Presentasi fragmen antigen *non-self* yang diikuti oleh sekresi IL-12 dan IL-18 yang kemudian menstimulasi sel T menghasilkan IFN- γ , akan mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi sel B yang ada di *germinal center* menjadi sel plasma dan sel memori (Campbell, 2004). Proliferasi sel B tersebut akan meningkatkan diameter *germinal center* (Bellanti, 1993). Proliferasi sel B merupakan bagian dari respon imun spesifik. Respon imun spesifik akan meningkat pada interaksi berulang dengan antigen yang sama.

Indonesia terletak di daerah tropis sehingga memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi bila dibandingkan dengan daerah subtropis ataupun kutub dan tersebar di daratan dan lautan. Teripang dikenal juga sebagai mentimun laut merupakan salah satu keanekaragaman hayati yang terdapat di lautan Indonesia. Samad (2000) menyatakan bahwa 10% dari jumlah jenis teripang yang ada di dunia berada di perairan Indonesia. Namun demikian, pemanfaatan teripang di Indonesia secara domestik relatif sangat sedikit dan mungkin tidak signifikan dalam nilai dan jumlah, karena produk teripang terutama ditujukan untuk ekspor (Darsono, 2005).

Keberadaan teripang di pantai timur Surabaya ditemukan adanya 7 spesies yang semuanya tidak tercantum dalam daftar teripang bernilai komersial di

pasar global. Salah satu jenis teripang dari perairan pantai timur Surabaya adalah *Phyllophorus sp* yang dalam bahasa lokal sering disebut sebagai terung dengan kelimpahan tertinggi yaitu 44,4 % dan tingkat distribusi tinggi yaitu dengan indeks distribusi 1,9062 (Winarniet *al*, 2010). Di wilayah Surabaya dan sekitarnya, *Phyllophorus sp* memiliki nilai komersial hanya dalam bentuk makanan terung goreng dan beberapa jenis teripang lain biasanya dalam bentuk mentah digunakan sebagai bahan masakan cina yang diyakini mempunyai khasiat tertentu. Beberapa peneliti telah mengidentifikasi adanya kandungan senyawa golongan glikosida triterpen dari berbagai jenis teripang di dunia. Beberapa telah teridentifikasi struktur kimiawinya. Golongan triterpenoid/steroid merupakan senyawa yang larut dalam pelarut non polar seperti n-heksan, sedangkan golongan alkaloid termasuk senyawa semi polar yang dapat larut dalam pelarut semi polar. Sedangkan senyawa flavonoid dan tanin dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, etilasetat, atau pelarut polar lainnya (Harborne, 1984). Uji yang digunakan untuk mengetahui keberadaan triterpenoid ialah reaksi Lieberman-Burchard (Harborne, 1987). Teripang menunjukkan bioaktivitas sebagai anti jamur, anti mikroba, sitotoksik dan imunomodulator (Chen, 2003; Dang *et al.*, 2007; Thanh *et al.*, 2006).

Imunomodulator adalah bahan-bahan yang dapat mengembalikan fungsi respons imun yang terganggu dari berbagai komponen sistem imun (*imunorestorasi*), memperbaiki dan memperkuat respons imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem imun (*imunostimulant*) atau menekan respons imun yang fungsinya berlebihan (*imunosupresi*) (Baratawidjaja, 2006). Imunostimulator adalah bahan yang dapat meningkatkan atau merangsang kerja komponen - komponen sistem imun (Anderson, 1999; Baratawidjaya, 2006). Glikosida triterpen memiliki peran yang kuat sebagai

imunostimulator yaitu dengan menstimulasi aktivitas lisosom makrofag mencit (Aminin *et al.*, 2001) sehingga meningkatkan kadar IL-12 dan berperan dalam meningkatkan proliferasi sel B dan sel T limpa yang diperlukan dalam pertahanan melawan patogen (Aminin *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2008). Fungsi ini diperlukan untuk meningkatkan kemampuan eliminasi makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, mengingat bahwa *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai kemampuan bertahan hidup dan berbiak di dalam makrofag.

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berjumlah 60 ekor strain BALB/C umur 3-4 bulan dengan berat badan antara 30-40 gram. Mencit tersebut diperoleh dari Unit Pengadaan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada (UPHP), Yogyakarta. Mencit kemudian diaklimasi pada kandang plastik tertutup kawat kasa, kondisi ruang/kandang hewan berventilasi dengan sistem penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap selama 10 hari. 10^6 CFU/ml koloni bakteri *M. tuberculosis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi RSUD. Dr. Soetomo, Surabaya. Dan teripang jenis *Phylloporus sp.* diperoleh dari Pantai Timur Surabaya. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, bahan-bahan kimia (pelarut) yang terdiri dari larutan n-heksan, etil asetat dan etanol untuk fraksinasi teripang, dan larutan *carboxy methyl cellulose* (CMC) 0,5%, *chloroform* untuk anestesi.

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak teripang dan fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak etanol dinding tubuh teripang. Teripang basah dikeluarkan isi perutnya, dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Teripang dipotong-potong kecil-kecil lalu ditimbang berat basahya. Selanjutnya teripang dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* pada suhu -46°C dengan

tekanan 5 mTorr. Teripang yang sudah kering ditimbang kemudian diblender hingga menjadi serbuk,

Serbuk teripang kering diekstrak berturut-turut dengan menggunakan tiga jenis pelarut dengan metode maserasi untuk menghasilkan fraksi yang berbeda yaitu n-heksan, etil asetat, dan etanol. Maserasi dengan n-heksan dilanjutkan dengan pelarut semipolar (etil asetat) dan etanol sebagai pelarut polar. Masing-masing tahap diulang-ulang hingga pelarut jernih. Pelarut diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C, hingga terbentuk fraksi-fraksi nonpolar, semi polar dan polar

Identifikasi triterpen dilakukan secara semikuantitatif dengan tujuan mengetahui perbandingan kadarnya antara ekstrak, fraksi n-heksan (non polar), fraksi etil asetat (semi polar), dan fraksi etanol (polar).

Di dalam penelitian ini hewan coba mencit dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan teripang, sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang diberi perlakuan teripang. Perlakuan teripang dilakukan mulai hari ke-1 hingga hari ke-14. Kelompok kontrol dibagi lagi menjadi kelompok kontrol positif (KP) dan kelompok kontrol negatif (KN). Kelompok perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok dengan perlakuan ekstrak n-heksan atau kelompok fraksi non polar (FN), kelompok dengan perlakuan ekstrak etil asetat atau kelompok fraksi semi polar (FS), kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol atau kelompok perlakuan fraksi polar (FP).

Kelompok perlakuan (FP, FN, FS) dan kelompok kontrol positif (KP) masing – masing dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok yang diinjeksi

Pembuatan sediaan limpa mencit dilakukan melalui beberapa tahap (Sugiharto, 1989), yaitu: tahap pencucian (*washing*) dan *processing*, tahap

M. tuberculosis satu kali dan yang diinjeksi *M. tuberculosis* dua kali. Injeksi *M. tuberculosis* pertama dilakukan pada hari ke-14, dan diinjeksi kedua pada hari ke-18. Kelompok yang diinjeksi *M. tuberculosis* satu kali dikorbankan pada hari ke-17 (KP17, KN17, FS17, dan FP17) dan yang diinjeksi *M. tuberculosis* dua kali dikorbankan pada hari ke-28 (KP28). Kontrol negatif hanya diberi pelarut, tanpa injeksi *M. tuberculosis*, dibedakan menjadi kelompok yang dikorbankan pada hari ke-17 (KN17) dan pada hari ke-28 (KN28).

Hewan coba 60 ekor mencit jantan yang digunakan dalam penelitian dibagi dalam 10 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit jantan. Pada 10 kelompok, 4 kelompok kontrol diberi tanda KP17, KP28, KN17, dan KN28. Sedangkan 6 kelompok perlakuan diberi tanda FN17, FN28, FS17, FS28, dan FP17, FP28

Pemberian perlakuan per oral (fraksi – fraksi teripang atau pelarutnya untuk kontrol) diberikan mulai hari ke-1 sampai hari ke-14. Dosis yang diberikan berdasarkan pada Chang-Lee *et al.*, (1989), Aminin *et al.*, (2001), dan Dong *et al.*, (2008), yaitu setara dengan 0,0462 g berat kering teripang per mencit. Injeksi *M. tuberculosis* dilakukan intraperitoneal yang mengandung 10^6 CFU. Infeksi *M. tuberculosis* pertama dilakukan pada hari ke-14 sedangkan kedua pada hari ke-18. Mencit – mencit dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi dan sebelum diinjeksi *M. tuberculosis* dipindahkan ke BSL-3 FKH, Unair.

Pengambilan limpa mencit dilakukan melalui pembedahan pada hari ke-17 dan hari ke-28. Setelah proses pengambilan, limpa mencit dipindahkan di wadah yang telah terisi *buffer formalin*.

penanaman (*embedding*), tahap pemotongan (*sectioning*) dan penempelan (*afixing*) dan tahap pewarnaan (*staining*).

Diameter *germinal center* limpa diukur di bawah mikroskop pada perbesaran 40x. Diameter germinal center adalah rerata diameter yang ditentukan dari hasil pengukuran diameter terpanjang dan terpendek. Tiap individu diamati 6 irisan dengan jarak antar sediaan 20 μm dan tebal irisan sediaan 4 μm . Tiap irisan diamati 5 germinal center.

Analisis Data

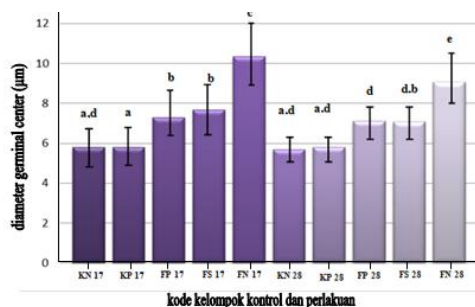
Data-data yang diperoleh adalah diameter *germinal center*. Data dianalisis lebih dahulu dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui distribusinya dan dilanjutkan dengan uji homogenitas variansi. Bila data tersebut berdistribusi normal dan bervariansi homogen, data kemudian diuji dengan analisis varian $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh bermakna dari perlakuan. Analisis data dilakukan pada $\alpha = 0,05$ jika hasil analisis varian menunjukkan beda bermakna ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji 2 kelompok perlakuan.

Hasil

Rerata diameter *germinal center* dari berbagai kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada tabel 1.

Perbandingan rerata diameter *germinal center* masing-masing kelompok dapat dilihat pada gambar 1.

Hasil ANAVA dapat dilihat pada tabel 2. Nilai p hasil ANAVA = 0,00 ($\alpha=0,05$).



Gambar1. Diagram rerata diametergerminal center yang terbentuk pada berbagai

kelompok perlakuan. Diagram yang diikuti dengan huruf yang berbeda menunjukkan ada beda bermakna dengan uji *Duncan* ($\alpha = 0,05$)

Pembahasan

Berdasarkan diagram gambar 4.1 bahwa pengaruh infeksi *M.tuberculosis* terhadap diameter *germinal center* pada KN17 dibandingkan dengan KP 17 tidak memiliki beda bermakna, begitu juga diameter *germinal center* pada KN 28 dibandingkan dengan KP 28, sama-sama tidak memiliki beda bermakna. Hal ini menunjukkan masuknya *M.tuberculosis* tidak meningkatkan diameter *germinal center* limpa *Mus musculus*. Hal ini mungkin dikarenakan oleh struktur dinding yang khas pada *M. tuberculosis* yang memiliki kemampuan memanipulasi sistem imun host (Dao et al., 2004)

Pengaruh pemberian ekstrak teripang dalam 3 fraksi yang berbeda pada *Mus musculus* yang telah diinfeksi oleh *M.tuberculosis* terhadap respon imun primer dapat dilihat dengan membandingkan KP 17 dengan FP 17, FS 17 dan FN 17. Selain itu untuk mengetahui fraksi yang paling berpengaruh terhadap diameter *germinal center* diameter *germinal center* pada FP 17, FS 17 dan FN 17 saling dibandingkan.

Berdasarkan hasil pengukuran diameter *germinal center* pada Lampiran 2 dan diagram pada gambar 4.2 antara KP 17 dengan FP 17, KP 17 dengan FS 17 dan KP 17 dengan FN 17 ketiganya menunjukkan beda yang bermakna. FN 17 memiliki beda paling bermakna dengan KP 17 karena rerata diameter *germinalcenter*nya hampir 2 kali lipat rerata diameter *germinal center* KP 17, setelah FN 17 disusul FS 17 kemudian FP 17. Jika dibandingkan antara rerata diameter *germinal center* FP 17 dengan FN 17 dan FS 17 dengan FN 17 rerata diameter *germina center* yang terbesar dimiliki oleh kelompok perlakuan FN 17 dan jikka FP 17 dibandingkan dengan FS 17, rerata diameter *germinal center* FS 17 lebih besar dibandingkan FP 17.

	Ulangan ke-	Injeksi <i>M.tb</i> 1 kali	Injeksi <i>M.tb</i> 2 kali
FN	1	99,8445	88,36
	2	102,675	87,024
	3	105,9495	85,5255
	4	102,7305	95,4045
	5	106,6155	97,347
	Rerata	103,563	90,731
FS	1	75,6465	69,3195
	2	74,037	65,490
	3	76,4235	70,4295
	4	82,251	76,923
	5	76,146	71,373
	Rerata	76,901	70,707
FP	1	73,038	71,484
	2	70,374	72,372
	3	72,2055	71,595
	4	75,924	71,096
	5	74,259	69,875
	Rerata	73,161	71,284
KN	1	54,384	56,115
	2	56,665	68,614
	3	62,612	52,614
	4	58,219	54,547
	5	62,049	55,333
	Rerata	58,786	57,445
KP	1	56,511	56,115
	2	60,534	64,216
	3	56,215	65,234
	4	62,014	53,29
	5	56,665	54,511
	Rerata	58,388	58,673

Tabel 1. Rerata diameter *germinal center* pada berbagai kelompok kontrol dan perlakuan.

Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa fraksi non polar merupakan fraksi yang paling optimal mempengaruhi respon imun primer berdasarkan besar diameter *germinal center*nya, disusul oleh fraksi semi polar kemudian fraksi polar.

Respon imun primer meliputi aktifitas fagositosis oleh makrofag sampai sekresi IL-12 oleh makrofag pada saat melakukan aktivitas fagositosis. Meningkatnya sekresi IL-12 akan diikuti dengan bertambahnya diameter germinal center. Makrofag merupakan fagosit yang lebih kuat daripada sel polimorfonuklear seperti neutrofil, karena seringkali mampu memfagositosis 100 bakteri. Makrofag juga mempunyai kemampuan untuk menelan partikel yang jauh lebih besar, bahkan sel darah merah utuh, sedangkan neutrofil tidak mampu memfagositosis partikel yang jauh lebih besar dari bakteri (Guyton *et al.*, 1997).

Pemberian ekstrak teripang dalam fraksi yang berbeda juga berpengaruh terhadap respon imun sekunder yang meliputi proses diferensiasi sel T hingga terbentuknya antibodi. Pengaruh ekstrak teripang yang diberikan dengan fraksi yang berbeda-beda terhadap respon imun sekunder dapat dilihat dengan membandingkan diameter *germinal center* KP 28 dengan FP 28, FS 28 dan FN 28, kemudian saling membandingkan diameter *germinal center* FP 28, FS 28 dan FN 28.

Diameter *germinal center* pada kelompok perlakuan KP 28 jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan FP 28, FS 28 dan FN 28 berdasarkan data pengamatan pada lampiran 2 dan gambar 4.1 menunjukkan bahwa kelompok perlakuan FN 28 menunjukan beda paling bermakna dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain, begitu juga pada perbandingan antara FP 28, FS 28 dan FN 28, rerata diameter *germinal center* paling tinggi pada kelompok perlakuan FN 28.

Untuk kelompok perlakuan berdasarkan pelarut ekstrak teripang yaitu fraksi polar (FP), fraksi semi polar (FS) dan fraksi non polar (FN), efektifitas teripang sebagai imunostimulator tampak maksimal pada perlakuan menggunakan pelarut non polar. Germinal center menunjukkan diameter maksimal pada

perlakuan dengan pelarut non polar, artinya teripang *Pyllophorus* sp mengandung senyawa glikosida triterpen yang sebagian besar larut di dalam larutan non polar. Pada kelompok perlakuan dengan fraksi polar (FP) dan semi polar (FS) menunjukkan diameter germinal center yang cukup besar dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (KP). Hal ini memperlihatkan bahwa adanya kemungkinan interaksi antar senyawa yang meningkatkan proliferasi sel B yang mengakibatkan bertambahnya diameter *germinal center*.

Pada kelompok fraksi nonpolar (FN) besar diameter *germinal center* maksimal jika dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal tersebut disebabkan kehadiran senyawa-senyawa dari golongan lain pada ekstrak yang berpengaruh terhadap proses kelarutan senyawa yang berfungsi meningkatkan kadar IL-12 (Kristantiet *al.*, 2008) dan selanjutnya akan meningkatkan diferensiasi sel T, sekresi IFN- γ , IL-4 dan IL-5 sehingga akan meningkatkan proliferasi sel B dan antibodi yang ditunjukkan dengan bertambahnya diameter *germinal center*. Pada proses ini bahan aktif bekerja dengan sintesis TLR untuk pengenalan struktur *M. tuberculosis* dengan cara memperbanyak ikatan TLR dengan komponen pada dinding sel *M. tuberculosis* sehingga meningkatkan produksi IL-12.

Glikosida triterpen merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam tubuh teripang dan memiliki potensi sebagai imunostimulatori (Hua., *et al.*, 2009). Meskipun demikian, diameter *germinal center* pada kelompok perlakuan fraksi polar dan semi polar yang diketahui mengandung senyawa glikosida triterpen menunjukkan hasil di bawah kelompok perlakuan menggunakan fraksi non polar. Faktor yang kemungkinan mempengaruhi hal ini salah satunya adalah struktur glikosida triterpen yang terdapat di dalam fraksi polar dan semi polar. Efek imunostimulatori berhubungan erat dengan struktur kimia glikosida triterpen

khususnya pada jumlah gugus fosfat di dalam molekul karbohidrat (Aminin *et al.*, 2001). Struktur glikosida triterpen pada fraksi polar dan semi polar diperkirakan berpengaruh dalam kemampuannya meningkatkan ikatan TLR dan protein MyD88 dengan komponen *M. tuberculosis* untuk memproduksi IL-12 (Werling dan Jungi, 2003).

Pada kelompok perlakuan FN (fraksi non polar) menunjukkan peningkatan diameter *germinal center* yang mungkin disebabkan oleh adanya senyawa bioaktif yang berasal dari kelompok gugus triterpen yang tidak terikat dengan gugus glukosa. Senyawa tersebut meningkatkan kadar IL-12 (Kristantiet *al.*, 2008), sehingga IFN- γ yang disekresikan oleh sel Th1 pun semakin besar sehingga aktivitas proliferasi sel B menjadi tinggi dan mengakibatkan bertambahnya diameter *germinal center*.

Untuk mengetahui potensi imunostimulator dari ekstrak teripang dalam berbagai fraksi terhadap respon imun primer dibandingkan rata-rata diameter *germinal center* kelompok KP 17 dengan kelompok FP 17, FS 17 dan FN 17. Antara KP 17 dengan FP 17 memiliki beda namun tidak begitu bermakna sama halnya dengan perbandingan rerata diameter *germinal center* antara KP 17 dengan FS 17. Perbedaan paling bermakna ditunjukkan pada perbandingan rerata diameter *germinal center* kelompok KP 17 dengan kelompok perlakuan FN 17. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak teripang pada fraksi non polar berpotensi menjadi imunostimulatori pada sistem respons imun primer. Sedangkan potensi imunostimulatori ekstrak teripang terhadap sistem respons imun sekunder dapat dilihat dari perbandingan diameter *germinal center* antara kelompok KP 28 dengan kelompok perlakuan FP 28, FS 28 dan FN 28. Pada perbandingan diameter *germinal center* antara kelompok KP 28 dengan kelompok perlakuan FP 28 terdapat perbedaan namun tidak terlalu bermakna,

sama halnya dengan perbandingan diameter germinal center antara KP 28 dengan FS 28. Perbandingan paling bermakna tampak pada perbandingan diameter *germinal center* KP 28 dengan FN 28, namun perbandingan diameter *germinal center* antara KP 28 dengan FN28 jika dibandingkan dengan perbandingan diameter *germinal center* KP 17 dengan FN 17 tampak bahwa perbandingan diameter *germinal center* antara KP 17 dengan FN 17 lebih bermakna. Hal ini berarti ekstrak teripang pada fraksi non polar lebih mempengaruhi sistem respon imun primer dibandingkan sistem respon imun sekunder.

Berdasarkan hasil uji ANOVA diketahui bahwa nilai probabilitas sebesar 0,000 lebih kecil dari $\alpha = 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

ANOVA					
diameter_GC					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10619.943	9	1179.994	73.917	.000
Within Groups	638.551	40	15.964		
Total	11258.495	49			

Tabel 2. Tabel hasil ANAVA satu arah

Kesimpulan

1. Berdasarkan perubahan histologi *germinal center* limpa mencit (*Mus musculus*) setelah injeksi *M.tuberculosis* satu kali pada hari ke-14 dan dua kali pada hari ke-14 dan hari ke-18 ekstrak teripang (*Phyllophorus sp*) berpotensi untuk menjadi imunostimulator.
2. Ekstrak teripang (*Phyllophorus sp*) fraksi non polar paling berpotensi untuk menjadi imunostimulator dibandingkan fraksi polar dan fraksi semi polar.

Daftar Pustaka

- Abbas, A. and Lichtman, A. 2003. *Cellular and Molecular Immunology, Fifth edition*, Elsevier Science, United States.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. 2001. Toll-like Receptors: Critical Proteins Linking Innate and Acquired Immunity. *J.Nature Immunology*, 2(8):675-680.
- Althunibat, O.Y., R.B. Hashim, M. Taher, J.M. Daud, M.A. Ikeda, and B.I. Zali. 2009. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. *European Journal of Scientific Research*. ISSN 1450-216X, 37(3): 376-387.
- Anderson WL. 1999. *Introduction to the Immune System: Innate and Acquired Immunity*. J. Immunology. Fence Creek Publishing. Madison.: 7-22.
- Anonimus. 2006a. Penyakit Tuberkulosis. <http://www.infopenyakit.com/2007/12/penyakit-tuberkulosis-tbc.html>. Diambil tanggal 10 September 2010.
- Anonimus. 2010. WildFact Sheets. <http://www.wildsingapore.com/wildfacts/echinodermata/holothuroidea/paracaudina.htm>. Diambil tanggal 21 Mei 2011.
- Anonimus. 2011b. Fungsi limpa dalam tubuh manusia (Online). <http://pathtalk.org/wp-content/uploads/2007/10/lung-tbc-600x.jpg>. Diambil tanggal 10 September 2010.
- Aminin, D., Agafonova, I., Berdyshev, E., Isachenko, E., Avilov, S., and Stonik, V., 2001, Immunomodulatory Properties of Cucumariosides from the Edible Far-Eastern Holothurian

- Cucumaria japonica*, *Journal of Medicinal Food*, 4(3):127-135.
- Arifah, S. and Purwanti, O. S. 2008. Pengaruh Pemberian Epineprin dan Hidrokortison Terhadap Jumlah dan Diameter *Germinal Center* Kelenjar Getah Bening Tikus Putih Jantan Wisting. *Berita Ilmu Keperawatan* ISSN 1979-2697, 1(3): 67-84
- Baratawidjaja, Karnen Garna, 1991. *Imunologi Dasar*, Edisi ke dua Jakarta: Balai Penerbit FKUI .
- Baratawidjaja. 2006. *Imunologi Dasar* , Edisi ke-7, FK Universitas Indonesia, Jakarta.
- Barnes P.F., and B. Wize. 2000. Type 1 Cytokines and Pathogenesis of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 161: 1773-1774.
- Bellanti, J. 1993. *Imunologi Umum*. Edisi ke-3. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 647.
- Burmester, G., and A. Pezutto. 2003. *Color Atlas of Immunology*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- Campbell, N. 2004. *Biology*. 7th Edition. Benjamin-Cummings Publishing Company.
- Chang-Lee, M.V., R.J. Price, and L.E. Lampila. 1989. Effect of Processing on Proximate Composition and Mineral Content of Sea Cucumbers (*Parastichopus* spp.). *Journal of Food Science*, 54(3): 567-568.
- Chen, J. 2003. Overview of Sea Cucumber Farming and Sea Ranching Practices in China. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* #18. May 2003.
- Chi T. 2005. Benefits of a Special sea Cucumber Extrac in Anti-angiogenic Therapy & RTK Inhibition For Cancer. *Journal of The American Naturopathic Association*, 9(2): 17-21.
- Choo PS. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. In V. Toral-Granda, A. Lovatelli and M. Vasconcellos (eds). *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 516. Rome, FAO. 3: 81-118.
- Dang, N.H., Thanh, N.V., Kiem, P.V., Huong, L.M., Minh, C.V and Kim, Y.H. 2007. Two New Triterpene Glycosides from the Vietnamese Sea Cucumber *Holothuria scabra*, *Arch. Pharm. res.*, 30 (11): 1387-1391.
- Dannenber, A. M. 1991. *Delayed-type Hypersensitivity and- cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis*. *Immunol. Today* 12: 228-233.
- Dannenber A M., Jr. 1994. Rabbit Model of Tuberculosis. In: Bloom B R, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington, D.C: *American Society for Microbiology*; 149-156.
- Dao, D., Kremer, L., Guerdel, Y., Molano, A., Jacobs, W., Porcelli, S., and Briken, V., 2004, *Mycobacterium tuberculosis* Lipomannan Induces Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages, *American Society for Microbiology*, 72(4): 2067-2074.
- Darsono, P. 2005. *Teripang (Holothurians) Perlu Dilindungi*. Ikatan Sarjana Oseanologi Indonesia. Diakses tanggal 9 Maret 2005.
- deJongh, R. 2010, *Tuberculosis*. <http://www.expat.or.id/medical/tuberculosis.html>. Diakses tanggal 10 September 2010.

- Delcenserie, V., D. Martel, M. Lamoureux, J. Amiot, Y. Boutin, and D. Roy. 2008. Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. *Curr. Issues Mol. Biol.* 10: 37-54. Horizon Scientific Press.
- Dong, P., Chang-Hu X., and Qi-Zhen D., 2008, Separation of Two Main Triterpene Glycosides from Sea Cucumber *Pearsonothuria graeffei* by High-Speed Countercurrent Chromatography, *Acta Chromatographica*, 20 (2):269-276.
- Ehlers, S., Lehmann, J., Mossmann, H., Alber, G., and Holscher, C., 2005, Interleukin-12p40 Mediates Transient Protection Against *Mycobacterium tuberculosis* infection in the Absence of Interleukin-12, *Immunobiology*, 210:217-227.
- Fedik, A. R. 2001. *Komunikasi Sel Imun*. Laboratorium Virologi dan Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 27 – 28.
- Forbes, B., Sahm, D., and Weissfeld, 2002, *Diagnostic Microbiology*, eleventh edition, Mosby Inc., St Louis Missouri, 538-540.
- Frobisher, M., L. Sommermeyer, and R. Fuerst. 1996. *Microbiology in Health and Disease*. 2nd Edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company. p. 381-391.
- Fulton SA, Reba SM, Martin TD., and Boom WH. 2002. Neutrophil-Mediated Mycobacteriocidal Immunity in the Lung During *Mycobacterium Bovis* BCG Infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*; 70: 7-5322.
- Fulton, S., Johnsen, J., Wolf, S., Sieburth, D., and Henry, W., 1996, Interleukin-12 Production by Human Monocytes Infected with *Mycobacterium tuberculosis*: Role of Phagocytosis, *American Society for Microbiology*, 64(7): 2523-2531.
- Gross, H, and Konig, GM. 2006. Terpenoids from Marine Organism: Unique Structure and Their Pharmacological Potential. *Phytochemistry Reviews*. 5(1): 115-141.
- Guyton A. C., Hall J. E. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC. 208 – 212, 219 – 223, 277 – 282, 285 – 287.
- Harborne, J.B. 1984. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall Ltd. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Metode Fitokimia. Penerbit: ITB. Bandung.
- Holt, G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. New York: William & Wilkins.
- Horner CC. 2006. Management Approaches to Intermittent Wheezing in Young Children." *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 7(2):180-184.
- Hua, H., Hua-Yang, Y., Ling, L., Liu, B., La, M., and Zhang, H., 2009, Antifungal Active Triterpene Glycoside from Sea Cucumber *Holothuria scabra*, *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44 (6):620-624.
- Jamb, S. 2007. *Mikrobiologi dan Immunologi*, Jakarta: Binarupa Aksara, 17-25.
- Jasin, M. 1992. *Zoologi Invertebrata*, CV. Sinar Wijaya, Jakarta.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., and Kelly, R.O. 1997. *Histologi Dasar*. Alih Bahasa . Jan Tambayong. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 271 – 272.

- Junqueira, L.C. U., and Carneiro, J. 2005. *Basic Histology: Text & Atlas*, McGraw-Hill Professional.
- Kerr, AM. 2000. *Holothuroidea* : Sea Cucumber <http://www.holothuroidea.htm>. Diakses tanggal 15 April 2011.
- Kim M. J., Kim H., Hwang S. S., Kim Y. W., Han S. K., and Shim Y., et al. (2009). Prevalence and its predictors of extrapulmonary involvement in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Korean Medical Science*, 24: 237-241
- Kristanti, A.N., Nanik SA, M. Tandjung, and B. Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Liao, Y., Pawson, D.L. and Liu, W. 2007. *Phyllophorus* (*Phyllophorus maculatus*), a New Species of Sea Cucumber from the Yellow Sea (Echinodermata: Holothuroidea: Dendrochirotida), *Zootaxa*, 1608: 31-34.
- Misnadiarly. 2006. *Tuberkulosis dan Mikrobakterium Atipik*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Misnadiarly, A.S. 2006. *Penyakit Infeksi TB Paru dan Ekstra Paru*. Jakarta: Pustaka Populer Obat.
- Moraes, G., Norhcote P.C., Kalinin, V., Avilov, S., Silchenko, A., Dmitrenok, P., Stonik, V., Levin, V.S., 2004, Structure of the Major Triterpene Glycoside from the Sea Cucumber *Stichopus mollis* and Evidence to Reclassify this Species into the New Genus *Australostichopus*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:637-650.
- Nontji, A. 2002. *Laut Nusantara*. Penerbit Djambatan, Jakarta.
- Nurhidayati. 2009. Efek Protektif Teripang Pasi (*Holothuria scabra*) Terhadap Hepatotoksitas Akibat Induksi Karbon Tetraklorida (CCl₄). Tesis. FK Unair. Surabaya.
- Pawson, D. and Pawson, D., 2008, *An Illustrated Key to The Sea Cucumber of South Atlantic Bight*, Smithsonian Institution, Washington.
- Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, and Cooper AM. 2000. Neutrophils Play a Protective Nonphagocytic Role in Systemic *Mycobacterium tuberculosis* Infection of Mice. *Infect Immun*; 68:577-83.
- Qin S, Zhang W, Qi P, Zhao M, Dong Z, and Li Y et al. 2008. Taxonomic Investigation of *Monascus purpureus* 94-25 Strain. *Journal of Culture Collection*. 2:1997-1998
- Ressang. 1984. *Patologi Khusus Veteriner*. Edisi ke-2. Penerbit Universitas Airlangga (UI-Press). Jakarta, Hal 173-174, 180-181.
- Robbins SL. 1957. *Pathologic basis of disease*. 5th edit., Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, WB Saunders Coy.
- Romimohtarto, K. and Juwana, S., 2001, *Biologi Laut: Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut*, Djambatan, Jakarta, 248-250.
- Samad, M.Y. 2000. Perbaikan Kualitas Produk Industri Kecil Teripang. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 3(3): 52-53.
- Sansonetti, P.J. 2006. The genus *Shigella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes. A handbook of the biology of bacteria*. New York: Springer Science + Business Media Inc, 99-116.

- Schluger NW. 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res*, 2: 157–163.
- Subowo, 2009, *Imunobiologi*, edisi 2, Sagung Seto, Jakarta, 89-118
- Sugiharto. 1989. *Bahan Pengajaran Mikroteknik*. Bogor : Depdikbud
- Somantri, I., 2009, *Asuhan Keperawatan pada Klien dengan Gangguan Sistem Pernafasan*, edisi 2, Salemba Medika, Jakarta, 67-72.
- Taylor GA, Ayala C, Coppens I, Ferguson DJ, Ling YM and Shaw MH. 2006. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages, 203:2063–2071
- Thanh, N.V., N.H. Dang, P.V. Kiem, N.X. Cuong, H.T. Huong, and C.V. Minh. 2006. A New Triterpene Glycoside from The Sea Cucumber *Holothuria scabra* Collected in Vietnam. *AJSTD*.23(4): 253-259.
- Tian F., Zhu C., Zhang X-w., Xie X., and Xin X-l. 2007. Philippioside E, a New Sulphated Saponin from Sea Cucumber, Blocks the Interaction between Kinase Insert Domain_Containing Receptor (KDR) and $\alpha\beta$ Integrin Via Binding to the Extracellular Domain of KDR. *Molecular Pharmacology*, 72:545-552.
- Tim Mikrobiologi FK UB, 2003, *Bakteriologi Medik*, Bayumedia publishing, Malang, 293-301.
- Tizzard, I. 1988. *Pengantar Imunologi Veteriner*. Edisi ke-2. Airlangga University Press. Surabaya. 91 – 106.
- Todar, K. 2009. *Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis*. University of Wisconsin.
- <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>. Diakses tanggal 29 April 2011
- Todar, 2011, *Todar's Online textbook of Bacteriology*, www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html. diakses 25 September 2012.
- Tortora, Funke, and Case, 2002, *Microbiology in Introduction Media Update*, seventh edition, Benjamin Cummings, San Fransisco, 663-664.
- van Crevel R., H.M.Ottenhoff, J.W.M, and van der Meer. 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*.15(2): 294-309.
- Werling, D. dan Jungi, Tw., 2003, Toll-like Receptor Linking Innate and Adaptive Immune Response, *Review Veterinary Pathology and Immunopathology*, 91:1-12.
- Winarni, D., M. Affandi, E.D. Masithoh, and A.N. Kristanti. 2010. Potensi Teripang Pantai Timur Surabaya Sebagai Modulator Imunitas Alami Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. *Laporan Penelitian Strategis Nasional*. Surabaya: UNAIR.
- Zhang, S-H., Ling-Li, Y-H Yi, Z-R Zou, and Peng-Sun. 2004. Philinopnegin A, B and C, Three New Triterpenoid Aglycones from Sea Cucumber *Pentacta quadrangulata*. *Marine Drugs*, 2:185-191.
- Zhang, Y., 2006, Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J Med Microbiol*, 55: 1527–1531.

