Potensi Imunomodulator Kombinasi *Andrographis paniculata* dan *Echinacea purpurea* Terhadap Total dan Jenis Leukosit pada Mencit yang Terpapar Stress Panas

The Immunomodulator Potency of Combination of *Andrographis paniculata* and *Echinacea purpurea* on Total and Differential Leucocytes Count in Mice with Heat Stress

[1]Dewa Ketut Meles,[2]Purnaning Dhian Isnaeni.[1]Wurlina,[1]Sri Mumpuni, [3] Niluh Suwasanti

[1] Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
[2]PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
[3]PPDS Patologi Klinik RS Sutomo

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Unair Jl. Mulyorejo Surabaya 60115
Telp.031-5992785. Fax.031-5993015
Email: dewa.meles@yahoo.co.id

Abstract

One of immune system components that had function to protect the body was white blood cell. Disturbance of immune system could cause the pathogen infect the body. One of the disturbances of immune system was stress, such as heat stress. *Andrographis paniculata* contained active compound andrographolide and *Echinacea purpurea* had polysaccharides compound that possesses immunomodulatory effect. This research used combination of *Andrographis paniculata* and *Echinacea purpurea* as immunomodulator on mice treated with heat stress in 39-40^{0}C. This research used 70 mice with different treatments: P0 (without immunomodulator), P1 (dosage of immunomodulator given was 0.00364 caps/mice/day), P2 (two times of P1 dosage), and P3 (two times of P2 dosage). The total and differential leucocyte count was done every week for four weeks. The result was analyzed by ANOVA and Tukey test, and resulted significant difference on total leucocyte count on first and third week. Significant differences were also seen on eosinophil count on first week, segmented neutrophil on third week, and limphocyte count on third week.

Keywords: *Andrographis paniculata*, *Echinacea purpurea*, immunomodulator,

Pendahuluan

Dalam tubuh hewan dan manusia terdapat suatu sistem yang memiliki fungsi menjaga kesehatan hewan atau manusia. Sistem ini dikenal dengan sistem kekebalan atau sistem imun.Terdapat dua sistem imun yang berbeda, yaitu sistem kekebalan bawaan dan adaptif, yang saling bekerja sama maupun secara terpisah dalam menjaga tubuh. Sistem kekebalan bawaan memberikan pertahanan pertama terhadap substansi asing. Sistem ini tidak spesifik, cepat, tidak memiliki memori imunologis, dan hanya berlangsung dalam durasi yang singkat. Sistem kekebalan adaptif memiliki spesifitas yang sangat baik, lebih lambat

dalam perkembangannya, memiliki memori imunologis, dan berlangsung lebih lama (Folds, 2008).

Davis, *et. al*. (2008), menyatakan bahwa penggunaan parameter hematologi seperti penghitungan relatif sel darah putih dari preparat hapusan darah dapat digunakan sebagai metode untuk menilai stres fisiologis. Kegagalan beradaptasi merupakan ketidak-mampuan untuk menghadapi stres, dan jika terus berlanjut, dapat berakibat kematian (Salak-Johnson dan McGlone, 2006). Dhabhar (2006) menyatakan bahwa stres dan hormon stres dapat menyebabkan perubahan signifikan pada jumlah dan proporsi relatif leukosit pada darah. Stres panas dapat menyebabkan penurunan jumlah leukosit dalam darah (Settivari, 2007).

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi sistem kekebalan adalah imunomodulator. Imunomodulator dapat didefinisikan sebagai suatu substansi, baik biologis maupun sintetis, yang dapat menstimulasi, menekan atau mengatur salah satu dari komponen sistem kekebalan, baik respon kekebalan spesifik maupun non spesifik (Agrawal dan Singh, 1999). Imunomodulator berfungsi mencegah perkembangan infeksi menjadi penyakit serta mencegah timbulnya infeksi sekunder (Vora, 2007).

Beberapa produk yang bekerja sebagai imunomodulator telah banyak beredar di masyarakat, salah satunya adalah Neoboost, yang mengandung ekstrak tanaman *Echinacea purpurea* dan *Andrographis paniculata*. Kedua tanaman tersebut dipercaya dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Namun demikian, produk tersebut masih harus melewati uji laboratoris agar dapat dinilai layak untuk dikonsumsi secara luas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian imunomodulator dengan bahan dasar sambiloto dan echinaceae terhadap jumlah dan diferensial sel darah putih mencit yang diberi stres panas.

Materi dan Metode Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina sebanyak 51 ekor dengan berat badan antara 20-30 gram. Mencit tersebut dibagi menjadi 3 kelompok sehingga tiap kelompok terdiri dari 17 ekor. Ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*) disingkat AP dan *Echinacea purpurea* disingkat EP sebagai imunomodulator yang dikemas dalam kapsul dengan merk dagang Neoboost produksi PT Darya Varia Lab, tbk., Gunung Putri, Bogor.Penghitungan jumlah dan diferensial leukosit, digunakan bahan antara lain EDTA, larutan pengencer Turk, pewarna Wright, dan minyak emersi.

Tempat stres panas digunakan ruangan dengan ukuran panjang 130 cm, lebar 75 cm, dan tinggi 50 cm yang terbuat dari papan kayu. Sebagai sumber panas digunakan enam bola lampu pijar dengan kekuatan masing-masing sebesar 60 watt.

Dosis Obat

Sediaan obat berupa kapsul dibuat menjadi sediaan suspensi untuk memudahkan pemberian pada mencit. Kapsul obat dihancurkan kemudian disuspensikan dalam CMC 0,5%. Jumlah suspensi disesuaikan dengan masing-masing dosis, dengan pemberian sediaan cair pada mencit adalah 0,5 ml per hari.

Dosis P1 (0,00364 kapsul/ekor/hari): Jumlah mencit yang diberi perlakuan adalah 17 ekor, sehingga jumlah kapsul yang dipergunakan untuk dosis P1 setiap hari adalah sebesar 17 x 0,00364 kapsul = 0,06188 kapsul/hari.Sediaan dibuat untuk jangka waktu selama 7 hari, sehingga jumlah kapsul yang dipergunakan untuk dosis P1 setiap minggu adalah 7 x 0,06188 kapsul = 0,43316 kapsul untuk 17 ekor mencit tiap minggu.Pemberian sediaan cair untuk tiap ekor mencit adalah sebanyak 0,5 ml, sehingga untuk 17 ekor mencit selama 7 hari, jumlah sediaan cair yang diberikan adalah sebesar 59,5 ml. Jadi, 0,043316 kapsul disuspensikan dengan CMC 0,5%

menjadi sediaan cair sebanyak 59,5 ml.Karena sediaan obat yang tersedia berbentuk *soft capsule*, maka pembuatan sediaan dihitung untuk setiap kapsul. Untuk dosis P1, 1 kapsul disuspensikan menjadi sediaan cair sebanyak1/0,43316 x 59,5 ml = 137,36 ml. Sediaan P2 dan P3 dibuat dengan cara yang sama. Dosis P2 adalah dua kali dosis P1, dan dosis P3 adalah dua kali dosis P2.

Perlakuan Stres Panas

Dalam satu hari, mencit diberi perlakuan stres panas selama 30 menit, kemudian diistirahatkan selama 15 menit. Setelah istirahat, mencit kembali diberi perlakuan stres panas selama 30 menit. Perlakuan diberikan selama tiga hari berturut-turut sebelum diberi kombinasi AP dan EP. Suhu yang digunakan dalam perlakuan ini adalah 39-40^{0}C

Pemberian Kombinasi AP dan EP

Obat diberikan secara per oral selama 28 hari setelah perlakuan stres panas. Setiap ekor mencit diberikan larutan obat sebanyak 0,5 ml. Hal ini dilakukan mengingat salah satu fungsi imunomodulator adalah untuk meningkatkan kembali sistem kekebalan tubuh setelah terpapar agen yang dapat menurunkannya.

Pengambilan Sampel Darah

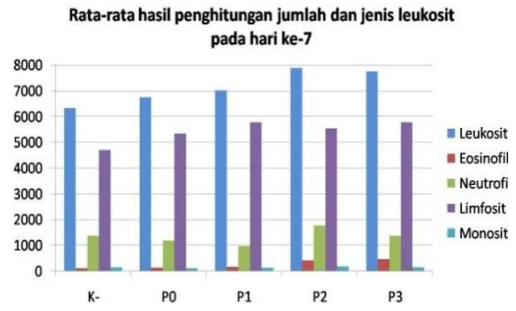
Sampel darah diambil dari jantung mencit dengan menggunakan spuit 3 ml, sebanyak 1 ml. Darah tersebut kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah diberi antikoagulan EDTA, kemudian digoyang hingga tercampur rata.

Pemeriksaan Jumlah dan Jenis Leukosit Mencit

Pemeriksaan jumlah dan jenis leukosit mencit menggunakan sampel darah yang telah diberi antikoagulan EDTA. Pemeriksaan jumlah leukosit menggunakan darah yang diencerkan dengan pelarut Turk dengan menggunakan pipet leukosit. Kemudian darah yang tersebut diisikan ke kamar penghitung "*improved Neubauer*", selanjutnya dihitung menggunakan mikroskop perbesaran 100X. Pemeriksaan jenis leukosit menggunakan darah yang telah diberi EDTA dan dibuat preparat hapusan darah dan menggunakan pewarna Wright. Pemeriksaan jenis leukosit dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000X., dengan diberi sedikit minyak emersi pada gelas objek.

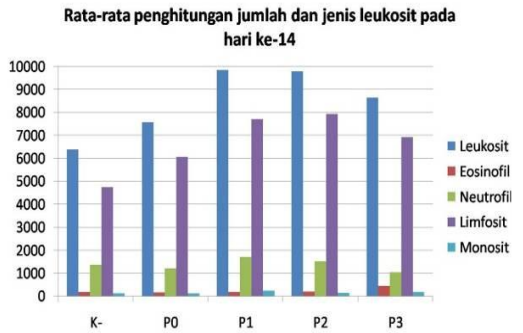
Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan analisis menggunakan ANAVA, pada hari ke-7 perlakuan menunjukkan perbedaan nyata pada jumlah leukosit (*p-value* = 0,024) dan jumlah eosinofil (*p-value* = 0,020).



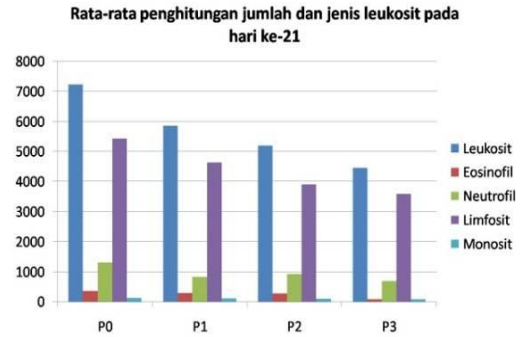
Gambar 1: Grafik jumlah dan jenis leukosit mencit pada hari ke-7

Pada hari ke-14 perlakuan tidak menunjukkan perbedaan nyata pada jumlah dan jenis leukosit mencit.



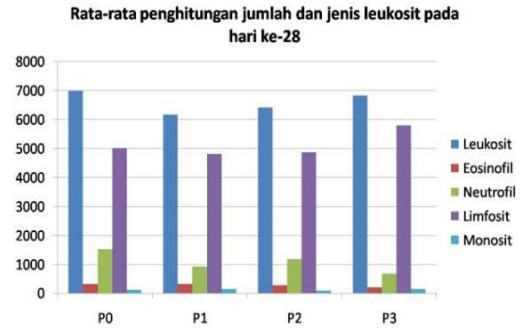
Gambar 2: Grafik jumlah dan jenis leukosit mencit pada hari ke-14

Pada hari ke-21 perlakuan menunjukkan perbedaan nyata pada jumlah leukosit (*p-value* = 0,025), jumlah neutrofil (*p-value* = 0,058), dan jumlah limfosit (*p-value* = 0,031).



Gambar 3: Grafik jumlah dan jenis leukosit mencit pada hari ke-21

Pada hari ke-28 perlakuan tidak memberikan perbedaan nyata pada jumlah dan jenis leukosit mencit.



Gambar 4: Grafik jumlah dan jenis leukosit mencit pada hari ke-28

Hasil yang didapatkan pada penghitungan jumlah leukosit mencit pada pemeriksaan awal serta hari ke-7 menunjukkan peningkatan jumlah leukosit pada kelompok yang diberi perlakuan stres panas dibandingkan pada kelompok yang tidak diberi stres panas. Hal ini dijelaskan oleh Dhabhar (2006) sebagai perubahan bifasik dalam jumlah leukosit dalam darah, karena stres dapat memicu pelepasan katekolamin dan glukokortikoid. Kedua hormon tersebut merupakan mediator utama dalam perubahan distribusi leukosit dalam darah yang diakibatkan stres.

Eosinopenia pada stres fisik dan emosional berhubungan dengan peningkatan kadar adenokortikosteroid dan katekolamin (Shcalm, 1975). Peningkatan jumlah eosinofil pada hari ke-7 pada perlakuan P3 menunjukkan efek imunomodulator dari kombinasi *Andrographis paniculata* dan *Echinacea purpurea*. Stres dapat memicu neutrofilia, namun hanya berlangsung selama paparan stres dan menurun secara berkala setelah paparan dihentikan (Davis, 2008). Pemeriksaan jumlah neutrofil tidak menunjukkan peningkatan dikarenakan saat pengambilan darah dilakukan jumlah neutrofil kembali normal. Pada hari ke-21 terjadi peningkatan jumlah neutrofil pada perlakuan P0, sehingga dapat diasumsikan bahwa perlakuan P0 mengalami stres.

Dhabhar (2002) menyatakan jumlah limfosit kembali normal setelah 3 jam paparan stres berhenti. Jumlah limfosit menurun selama stres, namun kembali normal setelah stres dihentikan (Davis, 2008). Pada hari ke-21 terjadi penurunan jumlah limfosit pada perlakuan P3. Penurunan ini dapat disebabkan stres atau keradangan akut (Brooks, 2010).

Jumlah monosit pada hari ke-7 hingga hari ke-28 tidak mengalami perubahan nyata. Sampai saat ini, belum terdapat sumber yang menjelaskan pengaruh stres panas terhadap jumlah monosit dalam darah.

Andrographis paniculata memiliki kandungan zat aktif yaitu andrographolide yang dapat menstimulasi respon imun alami pada mencit (Xu, 2009). Iruretagoneya *et al.* (2004) menyatakan bahwa senyawa andrographolide efisien dalam mengatur respon sistem imun dan dapat mempengaruhinya pada derajat yang berbeda. *Echinace purpurea* memiliki kandungan polisakarida yang memiliki aktifitas imunomodulator serta stimulasi fagosit, induksi sitokin makrofag, dan antioksidan (Bauer *et al.*, 1990). Kim *et al.* (2002) menyatakan

bahwa mekanisme peningkatan sistem imun oleh *Echinacea purpurea* dilakukan melalui peningkatan produksi dan aktifitas leukosit, limfosit, monosit, dan sitokin.

Kesimpulan

Pemberian kombinasi sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan *Echinaceae purpurea* berperan sebagai imunomodulator pada mencit yang dibuat stres dengan panas, yakni mampu meningkatkan jumlah leukosit pada hari ke-7 dan menurunkannya pada hari ke-21, serta memberi pengaruh terhadap peningkatan jumlah eosinofil pada hari ke-7, serta penurunan jumlah neutrofil dan limfosit pada hari ke-21, tetapi masih dalam batas-batas normal. Sementara itu, jumlah monosit tidak mengalami perubahan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT Darya Varia Lab, tbk., Gunung Putri, Bogor

Daftar Pustaka

Agrawal, S.S. and V. K. Singh. 1999. Immunomodulators : A Review of Studies on Indian Medicinal Plants and Synthetic Peptides Part I: Medicinal Plants. PINSA B65. Nos 3(4) : 179-204.

Bauer, R., M. Netshc, and M. H. Kreuter. 1990. Echinacea purpurea. Echinacea Handbuch fur Aerzte, Apotheker und Andere Naturwissenschaftler.

Brooks, H. W. 2010. Pathology of Veterinary Nurses. Wiley-Blackwell. Oxford.

Dhabhar, F. S. 2002. A Hassle a Day May Keep the Doctor Away: Stress and the Augmentation of Immune Function. Integ. And Comp. Biol. 42 : 556-564.

Dhabhar, F. S. 2006. Stress-induced Changes in Immune Cell Distribution and Trafficking: Implication for Immunoprotection versus Immunopathology. In: C. J. Welsh, M. W. Meagher, and E. M. Sternberg (Ed.). Neural and Neuroendocrine Mechanism in Host Defense and Autoimmunity. Springer Science+Business Media. New York.

Davis, A. K., D. L. Maney, and J. C. Maerz. 2008. The Use of Leukocyte Profiles to Measure Stress in Vertebrates: A Review for Ecologist. Functional Ecology. 22 : 760-772.

Folds, J. D. 2008. Overview of Immunology. In: M. R. G. O'Gorman and A. D. Donnenberg (Ed.). Handbook of Human Immunology 2nd Edition. CRC Press. Boca Raton. London. New York.

Iruretagoyena, M. I., J. A. Tobar, P. A. González, S. E. Sepúlveda, C. A. Figueroa, R. A. Burgos, J. L. Hancke, and A. M. Kalergis. 2004. Andrographolide Interferes with T Cell Activation and Reduces Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 312(1): 366-372.

Kim, L.S., R. F. Waters, and P. M. Burkholder. 2002. Immunological Activity of Larch Arabinogalactan and Echinacea: A Preliminary, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. Alternative Medicine Review. 7 (2): 138-149.

Salak-Johnson J. L. and J. J. McGlone. 2006. Stress and Immunity. Making Sense of Apparently Conficting Data in the Literature about Stress and Immunity: Aspects of the Immune System respond Differently to Stress [Review]. University of Illinois.

Schalm, O. W., N. C. Jain, E. J. Carroll. 1975. Veterinary Hematology 3rd edition. Lea and Febiger. Philadelphia.

Settivari R.S. 2007. Temporal Effects of Fescue Toxicosis and heat Stress on Rat Physiology and Hepatic Gene

Expression [Dissertation Doctor]. The University of Missouri, Columbia.

Vora, A. C. 2007. Role of Immunomodulators in the Management of MDR-TB. The Association of Physcians of India. Medicine Updates. India. 775-778.

Xu, Youhong. 2009. Adaptive Immune Response-modifying and Antimicrobial Properties of Andrographis paniculata and Andrographolide [Dissertation Doktor]. The University of Queensland.