

**Efek Imunostimulator Ekstrak Etanol Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*)
Terhadap Peningkatan Jumlah Sel T CD4 dan T CD8
pada Mencit BALB/C**

***Immunostrimulatory Effects of Extract Ethanol From Cinnamon (*Cinnamomum burmannii*) To The Increasing Number of Cells T CD4 dan T CD8
In Mice BALB/C***

Firmansjah A. Hasan¹⁾, Sri Murwani²⁾, Rositawati Indrati²⁾
Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
Email : ilupi10101991@gmail.com

ABSTRAK

Cinnamaldehyde yang terkandung dalam kayu manis (*C.burmanii*) dapat meningkatkan respon imunitas di dalam tubuh, tapi penelitian tentang efek imunostimulan dari *C.burmanii* untuk meningkatkan sel T CD4 dan sel T CD8 belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek imunostimulator ekstrak etanol *C.burmanii* terhadap peningkatan jumlah sel T CD4 dan sel T CD8. Metode penelitian ini adalah *experimental post test control design only* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Digunakan mencit BALB/C yang dibagi menjadi kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan. Kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol *C.burmanii* dengan dosis 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg secara per oral. Selanjutnya diinfeksi *Salmonella enteritidis* dengan dosis 0,2 ml X 10⁸ ml/CFU. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *one way ANOVA*, dengan $\alpha = 0,05$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C.burmanii* mempunyai efek imunostimulator yang ditandai adanya kenaikan jumlah sel T CD4 dan T CD8. Jumlah sel T CD4 tertinggi diperoleh pada pemberian ekstrak etanol *C.burmanii* dosis 100 mg/kg BB dan sel T CD8 pada pemberian ekstrak etanol *C.burmanii* dosis 50 mg/kg BB. Kesimpulan penelitian ini bahwa ekstrak etanol *C.burmanii* mempunyai efek imunostimulator yang ditandai dengan peningkatan sel T CD4 dan T CD8 pada mencit BALB/C yang diinfeksi *S. enteritidis*.

Kata Kunci : *Cinnamomum burmanii*, Sel T, *Cinnamaldehyde*, Imunostimulator

ABSTRACT

Cinnamaldehyde contained in cinnamon (*C.burmanii*) can improve the immune responses in the body, but the research on the immunostimulatory effects from *C.burmanii* to increase cells T CD4 and T CD8 had never been done. The purpose of this research is to know the Immunostimulatory effects of extract ethanol from Cinnamon (*C. burmannii*) to the increasing number of cells T CD4 and T CD8. Research using experimental post test control design only with a complete random design (RAL). Used mice BALB/C were divided into groups of positive control, negative control, and treatment. The treatment group was given ethanol extract of *C.burmanii* with a dose of 50 mg / kg, 100 mg / kg, 150 mg / kg, 200 mg / kg orally. Furthermore, *Salmonella enteritidis* infected with a dose of 0.2 ml X 10⁸ ml / CFU. Data obtained will be analyzed by using one-way ANOVA with $\alpha = 0.05$. The results of this study showed that the ethanol extract *C.burmanii* have immunostimulatory effects of a marked increase in the number of T cells CD4 and T CD8. The highest number of CD4 T cells obtained in the ethanol extract of *C.burmanii* dose of 100 mg / kg BW and CD8 T cells in the ethanol extract of *C.burmanii* dose of 50 mg / kg BW. The conclusion of this study that the ethanol extract *C.burmanii* have immunostimulatory effects characterized by the increasing of T cells CD4 and T CD8 in mice BALB / C infected by *S. enteritidis*.

Key Words : *Cinnamomum burmanii*, T cells, *Cinnamaldehyde*, Immunostimulatory.

¹⁾ Mahasiswa Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

²⁾ Dosen Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

PENDAHULUAN

Kayu manis mengandung minyak atsiri, *eugenol*, *safrole*, *Cinnamaldehyde*, tannin, kalsium oksalat, dammar, zat penyamak, dimana *Cinnamaldehyde* merupakan komponen yang terbesar yaitu sekitar 70% (Thomas dan Duethi, 2001). *Cinnamomum burmannii* memiliki senyawa bioaktif antibakteri dilihat dari pengujian yang dilakukan terhadap bakteri-bakteri *Salmonella typhosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Menurut Suherlan, (1995) bahwa aktivitas antibakteri paling kuat diberikan oleh fraksi n-heksana. Dari penelitian Arrar (2009) kayu manis juga terbukti sebagai antibakteri pada *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella anatum* dan *Escherichia coli*. *Cinnamomum burmannii* memiliki senyawa bioaktif antibakteri dilihat dari pengujian yang dilakukan terhadap bakteri-bakteri *Salmonella typhosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Minyak atsiri, flavonoid dan tannin telah diteliti sebelumnya dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh. *Cinnamaldehyde* juga diperkirakan dapat berperan dalam sistem imun tubuh. Telah dilakukan penelitian oleh Ramchandra (2006) mengenai aktivitas imunomodulator dari kayu manis jenis *Cinnamomum bark*. Imunomodulator adalah substansi yang mempengaruhi sistem imun (Fudenberet *et. al.*, 1978).

Imunostimulator dapat mengaktifasi sistem imun dengan berbagai cara seperti meningkatkan jumlah aktivitas sel T, *NK-cell*, dan makrofag serta melepaskan interferon dan interleukin (Rahardja, 2007).

Imunitas yang diperantarai oleh antibodi paling penting dalam penyakit yang diinduksi oleh toksin, penyakit mikroba dengan polisakarida kapsul sebagai penentu virulensi, dan pada pencegahan beberapa infeksi virus. Sistem imunitas yang diperantarai oleh sel meliputi beberapa tipe sel dan produk-produknya. Makrofag menyajikan antigen ke limfosit T melalui permukaan selnya yang ditempati oleh protein MHC. Reseptor sel T akan mengenali antigen selanjutnya klon sel T spesifik menjadi teraktivasi dan mulai berproliferasi. Sel T yang telah berproliferasi akan mengekspresikan CD4 dan CD8. CD4 akan mengalami proliferasi menjadi sel T efektor. Sel T efektor terbagi menjadi dua yaitu sel Th1 inflamasi atau sel Th2 helper. Sel Th1

mengaktifasi makrofag, mengeliminasi patogen dan menimbulkan imunitas yang diperantarai oleh sel. Sel Th2 akan menstimulasi imunitas humoral dengan mengaktifasi sel B untuk membuat antibodi. Sel Tc akan memusnahkan sel yang terinfeksi.

Penelitian ini menggunakan mencit BALB/C betina umur 6-7 minggu dengan berat badan sekitar 25-30 gram. Sebelumnya telah dilakukan penelitian tentang imunomodulator menggunakan mencit BALB/C tentang mekanisme imunomodulator ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*, L.) pada mencit BALB/C yang diinduksi vaksin hepatitis B oleh Sasmito, *et. al.* (2007). Mencit BALB/C betina ini telah mendapatkan jaminan *free pathogen*, tidak dalam keadaan estrus, dan tidak dalam keadaan bunting. Jadi, peneliti dapat memperkirakan data yang akan diperoleh tidak akan jauh berbeda dengan data pada percobaan menggunakan mencit BALB/C jantan. Penelitian tentang ekstrak etanol kayu manis sebagai imunostimulator terhadap mencit BALB/C belum pernah dilakukan sebelumnya, oleh karena itu peneliti melakukan penelitian ini.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan

Bahan Persiapan Hewan coba terdiri dari Alkohol 70%, serbuk gergaji, akuades, serbuk ekstrak etanol kayu manis, akuades steril untuk melarutkan serbuk ekstrak kayu manis, dan pakan. Bahan preparasi bakteri *S. enteritidis* dan pemeriksaan feses pada BALB/C terdiri dari media *Lactose Broth* (LB), media *MacConkey Agar Plate* (MCA), media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), akuades, alkohol 70%, Standart Mc Farland 0,5. Bahan pembedahan BALB/C setelah perlakuan, bahan, bahan preparasi organ limpa untuk *flowcytometry*, terdiri dari alkohol 70%, PBS steril, formalin. Bahan pengujian *flowcytometry* terdiri dari PBS steril, antibodi ekstraseluler staining CD4 dan CD8.

Alat pemeliharaan hewan coba terdiri dari kandang dari kotak plastik dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, meja tempat meletakkan kandang. Alat preparasi dan pemberian ekstrak etanol kayu manis (serbuk) pada hewan coba terdiri dari timbangan mikro *Mettler Toledo*, plastik klip, aluminium foil, sonde lambung, spuit 1 ml

Terumo, sendok makan, lap steril untuk memudahkan *handle* hewan coba. Alat untuk membuat suspensi bakteri *S. enteritidis* dan pemeriksaan feses pada mencit BALB/C terdiri dari cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, *Erlenmeyer*, rak tabung reaksi, ose, kapas, aluminium foil, autoklaf, bunsen, masker, sarung tangan, *sprayer* alkohol, tabung formalin. Alat pembedahan BALB/C setelah perlakuan, , preparasi organ limpa untuk *flowcytometri* terdiri dari gunting, pinset, papan pembedahan hewan coba, cawan petri *Pyrex*, tabung formalin, spuit 5 ml *Terumo*, spuit 1 ml *Terumo*, *filter milipore*, *blue tip*, *yellow tip*, tabung *ependof*, *sentrifuge tube*, rak *ependorf*, mikropipet 1000 mikroliter *Corning*, mikropipet 10 mikroliter *Corning*, sentrifus, *haemocytometer*, masker, sarung tangan, *tissue*. Sedangkan alat pada pengujian *flowcytometry* terdiri dari kuvet, *ependorf*, *BD FACS Calibur™ flowcytometer* dan *Software Cell Quest Pro™*.

Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini meliputi persiapan hewan coba, pembuatan sediaan ekstrak etanol kayu manis, pembuatan suspensi bakteri *Salmonella enteritidis*, perlakuan, *euthanasia*, preparasi limpa untuk pemeriksaan *flowcytometry*, penghitungan sel limfosit dengan *haemocytometer*.

Persiapan Hewan Coba

Persiapan pemeliharaan hewan coba berupa mencit BALB/C berjenis kelamin betina berumur 6-7 minggu dengan berat 25-30 gram, mendapatkan jaminan *free pathogen* tidak dalam keadaan estrus dan tidak dalam keadaan bunting diadaptasikan selama tujuh hari di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya. Hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan kondisi tubuh terhadap lingkungan baru. Sebelumnya mencit BALB/C diadaptasikan selama satu minggu di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA). Hewan coba dibagi dalam enam kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor mencit BALB/C. Selama adaptasi, mencit BALB/C diberi minum dan pakan standar berbentuk biskuit secara *ad libitum*.

Pembuatan Sediaan Ekstrak Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*)

Ekstrak kayu manis dibuat dari serbuk kering kulit batang atau ranting *Cinnamomum buranii* Ness ex Bl, suku Lauraceae, memiliki kandungan *Cinnamaldehyde*. Dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Satu bagian Serbuk kering mess (28/24) kulit kayu manis dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan 10 bagian etanol 70%. Direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk, kemudian dидiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara disentrifuse. Proses penyarian diulangi sekurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yg sama. Kemudian semua maserat dikumpulkan dan diuapkan dengan penguap tekanan rendah sampai diperoleh ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh 30%. Ekstrak kental ditimbang kemudian ditambahkan bahan pengisi 5% aerosil dan 65% amylum, setelah itu diaduk hingga merata dan siap untuk dikeringkan selama 10 jam dengan metode *freeze drying*.

Perlakuan

Mencit dikelompokkan dalam 6 kelompok secara acak dan diberi perlakuan sesuai kelompoknya selama 14 hari dengan pembagian sebagai berikut:

- Kelompok kontrol negatif (I), mencit hanya diberikan pakan standar.
- Kelompok kontrol positif (II), mencit diberi pakan standar dan pemberian infeksi *S. enteritidis* dengan dosis 0,2 ml x 10⁸ CFU/ml.
- Kelompok perlakuan 1 (III), mencit diberikan pakan standar dan pemberian ekstrak etanol kayu manis selama 14 hari dengan dosis 50 mg/kg BB kemudian diinfeksi *S. enteritidis* dengan dosis 0,2 ml x 10⁸ CFU/ml.
- Kelompok perlakuan 2 (IV), mencit diberikan pakan standar pemberian ekstrak etanol kayu manis selama 14 hari dengan dosis 100 mg/kg BB kemudian diinfeksi *S. enteritidis* dengan dosis 0,2 ml x 10⁸ CFU/ml.
- Kelompok perlakuan 3 (V), mencit diberikan pakan standar dan pemberian ekstrak etanol kayu manis selama 14 hari dengan dosis 150 mg/kg BB kemudian diinfeksi *S. enteritidis* dengan dosis 0,2 ml x 10⁸ CFU/ml.
- Kelompok perlakuan 4 (VI), mencit diberikan pakan standart dan pemberian ekstrak etanol kayu manis selama 14 hari dengan dosis 200 mg/kg BB kemudian

diinfeksi *S. enteritidis* dengan dosis 0,2 ml x 10⁸ CFU/ml.

Euthanasi

Euthanasi pada mencit dilakukan dengan cara dislokasi servicalis dilakukan sehari setelah hari terakhir perlakuan yaitu pada hari ke 23, sebelum dilakukan *euthanasi* dilakukan koleksi sampel feses terlebih dahulu dimasukkan pada plastik klip yang dilabel, disimpan dan dikultur pada media. Ditimbang berat badannya untuk mengetahui status kesehatan maupun gizi.

Mencit yang sudah dikoleksi feses dan ditimbang berat badannya diposisikan tengkurap di atas meja bedah, kemudian dengan menggunakan tongkat tumpul ditekan bagian servicalis dan ditarik bagian ekornya hingga terdengar bunyi tulang pada bagian tengkuk yang menandakan tulang tengkuk pada leher patah, dilakukan sesingkat mungkin agar mencit tidak mengalami kesakitan dan hindari pengeluaran kotoran pada mencit.

Preparasi Limpa Untuk Pemeriksaan Flowcytometry

Mencit disayat bagian abdomen sebelah kiri dengan menggunakan gunting bedah setelah itu dicari organ limpa kemudian diangkat, dibilas dengan PBS sebanyak dua kali, diletakkan dalam cawan petri yang berisi 5 ml PBS, digerus menggunakan pangkal spuit, disaring menggunakan *filter milipore*, dimasukkan dalam tabung propilen, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C kemudian diambil peletnya. Setelah didapatkan pelet ditambahkan PBS 1 ml, dihomogenkan dengan cara pipeting, diambil 100µl dimasukkan kedalam mikrotube baru, ditambahkan 500µl PBS, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C. Hasil dari sentrifugasi diambil bagian peletnya kemudian ditambahkan antibodi ekstraseluler (CD4 dan CD8) sebanyak 50 µl, dimasukkan dalam kuvet *flowcytometry*, dan kemudian dirunning dan dilihat persentase sel relatif.

Penghitungan Sel Limfosit dengan Haemocytometer

Pelet yang sudah didapatkan dari organ organ limpa diambil sebanyak 5µl ditambahkan 95µl *Trypan blue* dimasukkan dalam konikel 15 ml dan dihomogenkan

sehingga sel mati terwarnai dan sel hidup dihitung. Perhitungan untuk sel hidup menggunakan kamar hitung dalam *haemocytometer*. Hasil perhitungan digunakan sebagai jumlah sel absolut.

Rancangan Penelitian

Rancangan Penelitian menggunakan rancangan desain eksperimental murni atau *True Experimental Design*, desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test Control Only Design*. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). *Purposive sampling* yang digunakan adalah mencit BALB/C berjenis kelamin betina berusia 6-7 minggu dengan berat badan 25-30 gram, tidak dalam keadaan estrus maupun bunting serta mendapatkan jaminan *free pathogen*. Hewan coba dibagi menjadi enam kelompok perlakuan.

Analisa data jumlah sel limfosit T CD4 dan T CD8 menggunakan analisa statistik *One Way ANOVA*. Bila hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil yang signifikan maka dilakukan uji *post hoc test* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok perlakuan dengan tingkat kepercayaan () = 0,05 dan uji korelasi. Analisa data jumlah sel limfosit T CD4 dan T CD8 menggunakan analisa statistik *One Way ANOVA*. Bila hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil yang signifikan maka dilakukan uji *post hoc test* untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok perlakuan dengan tingkat kepercayaan () = 0,05 dan uji korelasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah sel T CD4 pada mencit BALB/C yang diberi perlakuan pemberian ekstrak etanol *C.burmanii* meningkat dibandingkan jumlah sel T CD4 pada kontrol negatif dan kontrol positif. Hasil uji Anova menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C.burmanii* memiliki pengaruh pada peningkatan jumlah sel limfosit T. Pada kontrol negatif jumlah sel T CD4 lebih rendah dibandingkan dengan jumlah sel T CD4 pada kontrol positif, artinya ketika mencit BALB/C diberikan infeksi *S.enteritidis* jumlah sel T CD4 akan mengalami peningkatan. Hal ini disebabkan karena bakteri *S.enteritidis* menginisiasi sistem imun mulai dari respon imun nonspesifik sampai respon imun spesifik.

Tahap awal respon terhadap infeksi, pengenalan mikroorganisme oleh makrofag

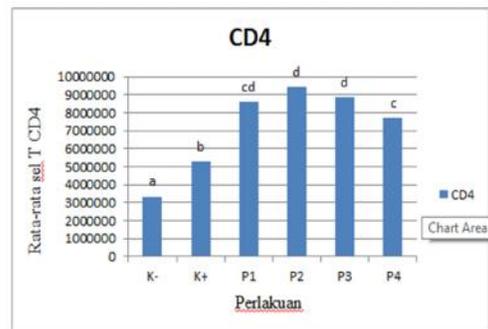
(fagositosis) dan aktivasi komplemen melalui jalur alternatif yang merupakan respon imun nonspesifik yang penting. Tahap selanjutnya adalah beberapa respon yang masih bersifat nonspesifik, misalnya pelepasan sitokin dari makrofag, dan pelepasan mediator lain yang memacu respon inflamasi. *S. enteritidis* merupakan bakteri intraseluler yang mengakibatkan fagositosis melalui hambatan fusi fagosom dan lisosom. Respon inflamasi terjadi dengan cepat dan secara umum bertanggung jawab menghambat penyebaran patogen sampai pada respon adaptif spesifik dimulai. Namun demikian beberapa mikroorganisme telah menemukan cara untuk menghindari respon imun nonspesifik ini, contohnya bakteri (*pneumokokkus*) yang memiliki kapsul kaya polisakarida sehingga dapat menghindari fagositosis, dan beberapa virus (seperti virus pox) yang menghasilkan homolog reseptor sitokin yang berfungsi sebagai antagonis kompetitif sitokin. Hal ini menyebabkan respon imun menjadi lambat dan cukup panjang waktu bagi mikroorganisme untuk tinggal dan menetap di tubuh. Kemudian dilanjutkan dengan respon imun spesifik (Jawetz, et.al, 2005). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mittrucker et. al, (2000), infeksi *Salmonella* pada mencit menginduksi respon sel Th1. Sebagian besar sel T CD4 akan teraktivasi setelah terjadi infeksi, sehingga meningkatkan jumlah sitokin dan meningkatkan sel T CD4.

Sel T CD4 yang telah teraktivasi akan berdiferensiasi tergantung tipe stimulan terutama adalah sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Penelitian ini sel T CD4 bekerja sebagai regulator dan fungsi efektor. Fungsi regulator terutama dilakukan oleh salah satu subset sel T yaitu CD4, untuk mengenal antigen bekerja sama dengan Mayor Hystocompatibility Complex (MHC) kelas II dan dikatakan sebagai MHC kelas II restriksi. Antigen endogen dihasilkan oleh tubuh inang. Sel-sel T CD4 mengeluarkan molekul yang dikenal dengan nama sitokin (protein berberat molekul rendah yang disekresikan oleh sel-sel sistem imun) untuk melaksanakan fungsi regulatornya. Sitokin dari sel T CD4 mengendalikan proses imun seperti pembentukan antibodi dengan bekerja sama dengan sel B.

Rata-rata jumlah sel T CD4 pada kontrol negatif adalah 3.335.987,5 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif sebesar 5.256.893.75. Perlakuan ekstrak

etanol *C.burmanii* pada P1, P2, P3, dan P4 memiliki jumlah sel T CD4 berturut – turut sebesar 8.583.075, 9.421.287,5, 8.848.643,75 dan 7.711.500 yang meningkat dibandingkan dengan kontrol positif (Lampiran 6).

Jumlah sel T CD4 pada P1 mengalami peningkatan dibandingkan dengan jumlah sel T CD4 pada kontrol positif, kemudian meningkat kembali pada P2 dan P3 secara optimal, walaupun berdasarkan rata-rata jumlah sel T CD4 pada P2 lebih besar daripada P3 akan tetapi hasil analisis statistika menunjukkan notasi yang sama (Gambar 5.1). Pemberian ekstrak etanol *C.burmanii* menyebabkan peningkatan jumlah sel T CD4 lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif disebabkan oleh adanya inisiasi respon imun secara langsung pada respon imun yang spesifik. Sedangkan jumlah sel T CD4 pada P4 berdasarkan gambar 5.1 mengalami penurunan ditandai dengan notasi yang berbeda dibandingkan P2 dan P3. Penurunan jumlah sel T CD4 pada P3 kemungkinan disebabkan karena pada dosis P4 sudah mengakibatkan gangguan dalam tubuh mencit BALB/C, bersifat toksik, atau sel-sel telah mengalami apoptosis. Penambahan ekstrak etanol *C.burmanii* dengan berbagai dosis dapat meningkatkan jumlah sel T CD4, P2 dan P3 merupakan dosis optimal peningkatan jumlah sel T CD4.



Gambar 3.1. Grafik Rataan Jumlah Sel T CD4 K-:Kontrol Negatif, K+:Kontrol Positif, P1:Dosis 50mg/kg, P2:Dosis 100mg/kg, P3:Dosis 150mg/kg, P4:Dosis 200 mg/kg

Meningkatnya jumlah sel T CD4 karena kandungan *Cinnamaldehyde* merupakan bahan imunostimulator yang memiliki fungsi untuk meningkatkan produksi sitokin dalam tubuh mencit BALB/C sehingga memicu aktivasi sel T dan meningkatkan jumlah sel

T CD4. Hal ini disebabkan karena herbal menginisiasi respon imun secara langsung pada respon imun adaptif, dimana secara langsung makrofag (melalui APCs) akan menangkap patogen atau antigen utama yang masuk kedalam tubuh. Antigen nonsel (dari luar) ini akan muncul kembali pada permukaan makrofag, kemudian digabungkan dengan protein yang disandi oleh MHC dan disajikan ke klon limfosit T. Kompleks MHC-antigen dikenali oleh reseptor spesifik pada permukaan sel T dan sel ini kemudian memproduksi berbagai macam sitokin yang menginduksi proliferasi klonal. Dua cara respon imunitas (yang diperantarai oleh sel dan antibodi) terjadi secara bersamaan.

Sel T CD4 yang telah teraktifasi akan berdiferensiasi tergantung tipe stimulan terutama adalah sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Penelitian ini sel T CD4 bekerja sebagai regulator dan fungsi efektor. Fungsi regulator terutama dilakukan oleh salah satu subset sel T yaitu CD4, untuk mengenal antigen bekerja sama dengan Mayor Hystocompatibility Complex (MHC) kelas II dan dikatakan sebagai MHC kelas II restriksi. Antigen endogen dihasilkan oleh tubuh inang. Sel-sel T CD4 mengeluarkan molekul yang dikenal dengan nama sitokin (protein berberat molekul rendah yang disekresikan oleh sel-sel sistem imun) untuk melaksanakan fungsi regulatornya. Sitokin dari sel T CD4 mengendalikan proses imun seperti pembentukan antibodi dengan bekerja sama dengan sel B.

Hasil uji korelasi (Lampiran 7) menunjukkan besar hubungan antara perlakuan yang dilakukan dengan jumlah sel T CD4 yang dihitung dengan koefisien korelasi adalah 0,739. Hal ini menunjukkan hubungan yang cukup erat (mendekati 1) di antara perlakuan dengan jumlah sel T CD4. Dimana teori analisis uji korelasi mengatakan bahwa angka korelasi di atas 0,5 menunjukkan korelasi yang cukup kuat, sedangkan di bawah 0,5 korelasi lemah. Arah hubungan yang positif (tidak ada tanda negatif pada angka 0,739) menunjukkan semakin besar pengaruh perlakuan yang diberikan akan membuat jumlah sel T CD4 meningkat. Tingkat signifikansi koefisien korelasi satu sisi dari output (diukur dari probabilitas) menghasilkan angka 0,000 atau praktis 0. Oleh karena probabilitas jauh di bawah 0,05, maka korelasi antara perlakuan dengan jumlah sel T CD4 sangat nyata.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah rata-rata sel T CD8 pada mencit BALB/C dengan perlakuan diberikan *C.burmanii* P1 mengalami peningkatan secara optimal dibandingkan dengan jumlah sel T CD8 pada kontrol negatif dan kontrol positif dengan rata-rata jumlah sel T CD8 sebesar 6.492.762,5. Sedangkan pada dosis ekstrak etanol *C.burmanii* P2, P3, dan P4 mengalami peningkatan dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif dan mengalami penurunan dibandingkan dengan P1 dengan jumlah rata-rata sel T CD8 berturut-turut sebesar 5.495.250, 5.226.225 dan 5.198.125. Jumlah rata-rata sel T CD8 pada kontrol positif dan kontrol negatif berturut-turut adalah 5.535.150 dan 3.710.743,75 (Lampiran 6).

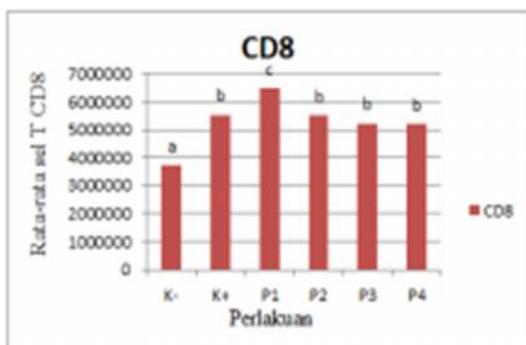
Perlakuan kontrol positif jumlah sel T CD8 mengalami peningkatan dibandingkan perlakuan kontrol negatif karena adanya infeksi *S. enteritidis*. Sedangkan dibandingkan dengan P1 jumlah sel T CD8 lebih tinggi dibanding kontrol positif, hal ini disebabkan karena infeksi *S.enteritidis* menginisiasi respon imun secara lambat yaitu mulai dari respon imun nonspesifik dan kemudian sampai pada respon imun spesifik. Berbeda dengan P1 dengan pemberian ekstrak etanol *C.burmanii* yang menginisiasi respon imun secara langsung yaitu respon imun spesifik dalam hal ini yaitu limfosit T yang mengekspresikan sel Tc CD8.

Limfosit T mengeluarkan subsetnya, yaitu CD8, mengenali antigen endogen untuk berikatan dengan MHC kelas I, dan ini dikatakan sebagai MHC kelas I restriksi (Tizard, 2003). Sitotoksik sel T (CTLs) atau CD8 berperan pada respons imun terhadap antigen virus pada sel yang diinfeksi dengan cara membunuh sel yang terinfeksi untuk mencegah penyebaran infeksi. Sel T CD8 yang terinfeksi selanjutnya akan mengenal antigen yang berikatan dengan molekul MHC-1 pada respons imun normal, MHC-1 yang sudah berikatan tersebut menghasilkan nukleated. Jika MHC-1 berikatan dengan fragmen antigen, atau jika MHC-1 mengalami transformasi, Sel T CD8 (sitotoksik) akan mengalami hambatan imunitas.

Hasil uji post hoc didapatkan hasil bahwa P1 mengalami peningkatan secara optimal dibandingkan dengan perlakuan lain. Kemudian mengalami penurunan pada P2, P3, dan P4. P2, P3, dan P4 tidak berbeda nyata dengan kontrol positif, ditunjukkan

dengan notasi yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel T CD8 dosis 50 mg/kg BB sudah memberikan efek yang optimal dalam meningkatkan sistem imun dalam tubuh mencit.

Penurunan jumlah sel T CD8 seperti pada jumlah sel T CD4 dalam penelitian ini kemungkinan disebabkan sel yang telah mengalami apoptosis atau pada dosis ekstrak etanol tersebut sudah bersifat toksik. Apoptosis dapat terjadi secara langsung ketika sel yang rusak tidak bisa diperbaiki lagi atau terinfeksi oleh virus. Apoptosis dapat berasal dari sel itu sendiri, dari jaringan di sekitarnya, atau dari sel yang merupakan bagian sistem imun. Jika kemampuan sel untuk ber-apoptosis rusak atau jika inisiasi apoptosis dihambat, sel yang rusak dapat terus membelah tanpa batas, berkembang menjadi kanker (Abbas, et al., 2007).



Gambar 3.2. Grafik Rataan Jumlah Sel T CD8 K-:Kontrol Negatif, K+:Kontrol Positif, P1:Dosis 50mg/kg, P2:Dosis 100mg/kg, P3:Dosis 150mg/kg, P4:Dosis 200 mg/kg

Hasil uji korelasi (Lampiran 7) menunjukkan besar hubungan antara perlakuan yang dilakukan dengan jumlah sel T CD8 yang dihitung dengan koefisien korelasi adalah 0,306. Hal ini menunjukkan hubungan yang lemah (jauh dari 1) di antara perlakuan dengan jumlah sel T CD8. Dimana teori analisis uji korelasi mengatakan bahwa angka korelasi di atas 0,5 menunjukkan korelasi yang cukup kuat, sedangkan di bawah 0,5 korelasi lemah. Arah hubungan yang positif (tidak ada tanda negatif pada angka 0,306) menunjukkan semakin besar pengaruh perlakuan yang diberikan akan membuat jumlah sel T CD8 meningkat. Tingkat signifikansi koefisien korelasi satu sisi dari output (diukur dari probabilitas) menghasilkan angka 0,146. Oleh karena probabilitas jauh di atas 0,05, maka korelasi

antara perlakuan dengan jumlah sel T CD8 tidak nyata.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah sel T CD4 dan T CD8 pada perlakuan dengan pemberian dosis lebih tinggi dibandingkan pada kontrol positif yang hanya diberi infeksi *S. enteritidis* saja. Hal ini dapat diartikan bahwa ekstrak etanol *C.burmanii* dapat memaksimalkan peningkatan jumlah sel T CD4 dan T CD8. Pinca dkk (2013) dan Lestarini (2008) menyatakan bahwa herbal dapat memaksimalkan kemampuan fungsi sistem imun dibandingkan dengan pemberian infeksi bakteri saja. Pada penelitian Goel, et. al (2012), Echinaceae sp yang merupakan tanaman herbal dapat lebih meningkatkan sistem imunologis subset CD4 dan CD8 imunogenik, antara lain TNF- .

Selain itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel T CD4 lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah sel T CD8. Jumlah sel T CD4 yang lebih tinggi ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C.burmanii* lebih berfungsi pada sistem imun humoral dibandingkan pada sistem imun seluler. Artinya sistem imun lebih banyak bekerja dalam pembentukan antibodi daripada menghancurkan sel jaringan yang terinfeksi. Limfosit T memegang peranan penting dalam sistem imun spesifik, terbagi dalam dua jenis yaitu sel T CD4 dan sel T CD8. Sel T CD4 berperan mengaktifasi makrofag untuk menghancurkan mikroba, aktivasi makrofag oleh CD4 memicu terjadinya inflamasi dan repair terhadap jaringan yang rusak. Sel CD4 sendiri terbagi menjadi dua subset, Th1 dan Th2, yang memproduksi jenis sitokin yang berbeda. Sementara itu, sel CD8 berperan menghancurkan sel yang telah terinfeksi mikroba intraselular (Dharmana, dkk., 2007).

Cinnamaldehyde memiliki peranan penting dalam peningkatan respon imun dalam tubuh. *Cinnamaldehyde* diketahui penting dalam aktivasi sel dalam sistem imun serta dalam karsinogenesis. Pada banyak kasus , inhibisi tumor tergantung secara langsung dari aktivitas CD8 sitotoksik. Meskipun demikian ternyata CD4 mempunyai peranan yang penting dalam modulasi sistem imun terutama dalam hal efek jangka panjang anti tumor (Cheng T, et al., 2012). Pada karsinoma mammae, sel T CD4 mempunyai fungsi sebagai helper atau effektor sel untuk respon anti tumor. Sel T CD4 menunjukkan peran penting dalam hal imunitas antitumor oleh adenoviral HER2

vaksin. CD8 dalam hal ini justru tidak mempengaruhi respon antitumor (Jong M, et al., 2013).

Penelitian sebelumnya tentang imunomodulator dari kayu manis jenis cinnamon bark oleh Ramchandra (2006) mengatakan bahwa pada dosis rendah cinnamon bark (10mg/kg BB) *Cinnamaldehyde* hanya mengakibatkan produksi serum immunoglobulin meningkat sedangkan pada dosis tinggi cinnamon bark (100 mg/kg BB) memberikan efek meningkatkan serum immunoglobulin, meningkatkan adhesi neutrofil. Artinya pada dosis 100 mg/kg BB memiliki potensi sebagai aktifitas imunostimulan.

Hasil penelitian sebelumnya dengan penelitian yang sudah dilakukan dapat ditunjang oleh penelitian yang dilakukan oleh Ramchandra (2006), bahwa ekstrak etanol *C.burmanii* memiliki potensi bekerja sebagai imunostimulan. *Cinnamaldehyde* berpotensi bekerja terhadap sitokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel T CD4 dan T CD8 untuk melakukan respon imun. Jumlah sel T CD4 dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah sel T CD8. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C.burmanii* lebih berfungsi sebagai pertahanan tubuh terhadap antigen yang masuk dibandingkan sebagai penghancur antigen.

Menurut Wijayanti,dkk (2009) minyak atsiri yang terkandung dalam *C.burmanii* juga bersifat sebagai antioksidan dan antibakteri. *C.burmanii* dapat digunakan untuk membunuh bakteri melalui penghambatan sintesis dinding sel/ membran sehingga pada mencit yang diberi ekstrak etanol *C.burmanii* pada penelitian ini sudah tidak terdapat bakteri dibandingkan kontrol positif. Hal ini diperkuat oleh penelitian Santoso dkk (2011) tentang uji efektivitas ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* secara in vitro bahwa *C.burmanii* bersifat antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh kesimpulan bahwa:

1. Ekstrak etanol kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) mempunyai efek

imunostimulator yang ditandai dari kenaikan jumlah sel T CD4 dan T CD8.

2. Kandungan *Cinnamaldehyde* ekstrak etanol kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) lebih berfungsi pada sistem imun humoral dibandingkan pada sistem imun seluler yang ditandai dari jumlah sel T CD4 lebih tinggi dibandingkan sel T CD8.

SARAN

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini yaitu perlunya dilakukan penelitian lanjutan tentang:

1. Efek imunostimulator *C.burmanii* dengan pemberian setelah infeksi bakteri *S. enteritidis*.
2. Uji toksisitas ekstrak etanol *C.burmanii* terhadap mencit BALB/C.
3. Imunostimulator terhadap infeksi *S. enteritidis* dengan menggunakan dosis ekstrak etanol *C.burmanii* pada rentang lebih sedikit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih pada dosen pembimbing dan teman-teman atas saran dan kritik dalam perbaikan artikel penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman and S. Pillai. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th edition. Saunders Elsevier. 66-67
- Araar, H. 2009. *Cinnamon Plant Extracts : a Comprehensive Physico-Chemical And Biological Study For Its Potential use as a Biopesticide*. [Thesis]. Master of Science in Mediterranean Organic Agriculture. Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari
- Cheng T, Ting Chang, Sheng W, Po Jen, Ching Tai, Angel C,etc. 2012. *Maintenance of CD8 effector T cells by CD4 Helper T cells eradicates growing tumors and promote long term immunity*. J of science direct 2006; 24 : 6199-207.
- Dharmana E, Susilaningsih N, Widjayahadi N. 2007. *Pengaruh Pemberian Tolak Angin Cair terhadap Jumlah Sel T, Kadar IFN- , dan IL-4*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. 2012. *Echinacea stimulate macrophage function in lung*

- and spleen of normal rats.* J Nutr. Biochem. 2002; 13(8) : 487.
- Lestari IA. 2008. *Pengaruh Pemberian Phyllanthus niruri L terhadap Respon Imunitas Seluler Mencit Balb/c yang diinfeksi Salmonella typhimurium.* Semarang : Pasca Sarjana Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Mittrucker H. W. and S. H. Kaufmann. 2000. *Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice.* Journal of Leukocyte Biology vol. 67 no. 4 457-463
- Pinca S, Muhammad Sasmito Djati, Muhaimin Rifa'i. 2013. *Analisis Mobilisasi Sel T CD4 dan CD8 pada Timus Ayam Pedaging Pasca Infeksi Salmonella typhimurium dan Pemberian Simplisia Polyscias obtuse.* Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Ramchandra, N.S. 2006. *Immunomodulatory Activity Of Cinnamon Bark.* Rajiv Gandhi University Of Health Sciences. Karnataka, Bangalore.
- Sasmito Ediati, Nunung Yuniarti, dan CJ. Soegihardjo. 2007. *Mekanisme Imunomodulator Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda citrifolia, L.) Pada Mencit BALB/C Yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B.* Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Santoso, S., Endang, A., dan I Gusti N.R.S. 2011. *Uji efektifitas ekstrak etanol daun kayu manis (Cinnamomum burmanii) sebagai antimikroba terhadap bakteri Shigella dysenteriae secara in vitro.*
- Taufiq, L.H., Nurcahyanti, W., dan Arifah S.W. 2012. *Efek Antiinflamasi Ekstrak Patikan Kebo (Euphorbia hirta L) pada Tikus Putih jantan.* Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Wijayanti, W. A., Y. Zetra dan P. Burhan. 2011. *Minyak Atsiri Dari Batang Cinnamomum burmanii (Kayu Manis) Dari Famili Lauraceae Sebagai Insektisida Alami, Antibakteri Dan Antioksidan [Skripsi].* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember.