JURNAL FARMASI SAINS DAN KOMUNITAS, November 2012, hlm. 85-90 Vol. 9 No. 2
ISSN : 1693-5683

PENGARUH PEMBERIAN MADU HUTAN TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT PADA HEWAN UJI TIKUS JANTAN GALUR *WISTAR*

KARTIKA SARI SENAS, YUNITA LINAWATI

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

Abstract: *Forest honey is produced by wild bees by taking nectars from several kinds of plant. One of active chemicals contained within honey is flavonoid. It is believed as an immunomodulator due to it has role in fighting against free radicals and increasing body immune system against disease infection. This research aimed to understand the influences of forest honey administration to the lymphocyte proliferation on male mice Wistar family. This research is a pure, experimental with one way, random research design. Total of 20 rats was divided into 4 groups. Each group was given honey forest with dose of 0,27; 0.54; 1.08 mL/200 g BW, and negative control group was given aquadest 2.5 mL/200 g BW. The lymphocyte proliferation is measured from the amount of lymphocyte based on Optical Density (OD) values, the read on ELISA reader at the wavelength of 550 nm. The result shown that the administration of forest honey has effect on significance increase the lymphocyte proliferation ($p<0.05$) than negative control on male mice Wistar family.*

Key words *: Foresthoney, lymphocyte proliferation, immunomodulator*

1. Pendahuluan

Madu memiliki banyak khasiat, salah satunya adalah efek antioksidan karena memiliki zat flavonoid (Asari, 2009). Flavonoid adalah senyawa polifenol yang memiliki struktur kimia flavonol, flavon, flavanon, iso flavon, katekin, antosianidin dan kalkon. Saifulhaq (2006), membuktikan bahwa senyawa antioksidan yaitu flavonoid dapat dipercaya sebagai imunomodulator karena dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh terhadap infeksi penyakit, luka dan melawan radikal bebas.

Menurut Abuharfeil (*cit*., Haryanto, 2009), bahwa madu dengan konsentrasi 0,1% dapat menstimulasi aktivitas sel limfosit. Adanya aktivitas limfosit menunjukkan respon kekebalan tubuh terhadap infeksi khususnya pada luka. Sel limfosit menjalankan tugas menjaga respon imun spesifik yang meliputi respon imun seluler (limfositik yang berkaitan dengan sel T) dan humoral (berkaitan dengan antibodi di dalam darah atau sel B) (Roitt, 1997).

Penelitian ini diharapkan dapat memperjelas pengaruh madu hutan dalam meningkatkan sistem imun dengan melihat peningkatan proliferasi limfosit sehingga dapat diperoleh manfaat madu hutan sebagai imunomodulator.

2. Bahan dan Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan untuk menguji proliferasi limfosit adalah spuit injeksi 1mL (Terumo), jarum berujung tumpul, pipa kapiler, *Eppendorf*, neraca elektronik (Sartorius), incubator CO_2 5% 37˚C, sentrifus (Sorvall MC 12 V, Dupont), mesin Vortex (Super Mixer-K), *Laminar Air Flow Hood* , Haemositometer Nebaeur, *Inverted Microscope* (Olympus), ELISA *reader* (BioRad), *plate 96 well* (Nunc), mikropipet, tip biru, tip kuning, pinset steril, *freezer*, dan tabung reaksi.

2.2. Bahan

Madu hutan yang digunakan berasal dari hutan Kalimantan yang diperoleh dari salah satu distributor madu di Yogyakarta. Hewan uji yang digunakan adalah tikus galur *Wistar*, jantan, umur 2-3 bulan dengan bobot badan

100-300 g, yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Antigen yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang diperoleh dari Laboratorium Balai Kesehatan Yogyakarta. Kloroform 70%, *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI 1640) (Sigma), HEPES (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 20,0 mL (Gibco), alkohol 70% (v/v), akuabides steril, penisilin-streptomisin 4,0 mL (Gibco), fungizon 2,0 mL, ammonium klorida, *tris base*, *phytohaemagglutinin* dan MTT (Sigma).

2.3. Tata Cara Penelitian

2.3.1. Tahap penentuan dosis madu hutan

Dosis madu hutan untuk tikus 200 g yaitu : 0,018 x 15 mL = 0,27 mL/200 g BB.

2.3.2. Tahap praperlakuan hewan uji

Semua hewan uji ditimbang beratnya dan diadaptasikan selama satu hari untuk penyesuaian diri terhadap lingkungannya.

2.3.3. Tahap percobaan

Dosis madu hutan pada tahap orientasi yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit pada hewan uji secara signifikan digunakan sebagai dosis pertama. Kelompok dosis kedua dan ketiga ditetapkan dengan mengalikan dua kali faktor peringkat dosis. Tikus jantan galur *Wistar* sejumlah 20 ekor, umur 2-3 bulan, bobot badan 100-300 g dibagi secara random menjadi 4 kelompok dengan masing-masing kelompok berjumlah sebanyak 5 ekor. Kelompok-kelompok tersebut antara lain :

a. Kelompok kontrol negatif: kelompok tikus yang diberi akuades dengan volume pemberian 2,5 mL/200 g BB.
b. Kelompok perlakuan 1: kelompok tikus yang diberi larutan madu hutan dengan dosis 0,27 mL/200 g BB, dengan volume pemberian 0,675 mL/200 g BB.
c. Kelompok perlakuan 2: kelompok tikus yang diberi larutan madu hutan dengan dosis 0,54 mL/200 g BB, dengan volume pemberian 1,35 mL/200 g BB.
d. Kelompok perlakuan 3: kelompok tikus yang diberi larutan madu hutan dengan dosis 1,08 mL/200 g BB, dengan volume pemberian 2,7 mL/200 g BB.

2.3.4. Isolasi limpa dan kultur sel limfosit

Pada hari ke-18 tikus dikorbankan dengan cara dibius inhalasi menggunakan kloroform, lalu diletakkan dengan posisi terlentang di atas papan gabus. Kulit bagian perut dan selubung peritoneum dibuka kemudian limpa diambil dan dibersihkan dari lemak yang masih menempel.

Limpa diletakkan pada cawan petri yang berisi 5 mL RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), kemudian RPMI disemprot kedalam limpa untuk mendapatkan suspensi sel tunggal. Suspensi sel dimasukkan kedalam tabung sentrifus dan disentrifugasi pada 3000 rpm (Sorvall MC 12 V, Dupont) selama 5 menit untuk mendapatkan pellet. Pellet yang didapat disuspensikan dalam 1 mL dapar amonium klorida untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur dengan menggunakan pipet dan didiamkan pada suhu kamar selama 5 menit. Pellet dicuci 2 kali menggunakan RPMI dengan cara dipipet berulang-ulang dan disentrifugasi pada 3000 rpm (Sorvall MC 12 V, Dupont) selama 5 menit. Sel yang didapat ditambah media RPMI komplit sebanyak 2 mL. Sel limfosit dihitung jumlahnya menggunakan haemositometer dan pewarna biru trifan, kemudian diresuspensikan lagi dengan medium RPMI komplit sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^6$/mL . Suspensi sel yang telah dihitung kemudian dimasukkan kedalam sumuran-sumuran pada lempeng mikrotiter sebanyak 200 µl tiap sumuran. Selanjutnya dikultur dengan penambahan RPMI komplit dan PHA (*Phytohaemagglutinin*) pada tiap sumuran. Suspensi sel diinkubasi pada inkubator $C0_2$ 5% pada suhu 37˚C selama 24 dan 48 jam.

Uji pertumbuhan dan proliferasi sel limfosit menggunakan metode MTT *assay*. Suspensi sel yang telah diinkubasi selama 24 dan 48 jam kemudian ditambahkan 10,0 µl larutan MTT 5 mg/mL. Selanjutnya,

diinkubasi pada suhu 37˚C pada inkubator $C0_2$ 5% selama 4 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan *reagen stopper*, yaitu larutan SDS 10% dalam asam klorida 0,01 N sebanyak 100 µl pada tiap sumuran. Selanjutnya, diukur *Optical Density* (OD) menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 550 nm (Wahyuniari, 2009).

2.3.5. Analisa Hasil

Data proliferasi limfosit dianalisis secara statistik dengan uji normalitas menggunakan metode uji *Kolmogorov-Smirnov.* Data yang terdistribusi normal (p > 0,05) dilanjutkan dengan uji parameter menggunakan *one way* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%, kemudian jika data terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji Tuckey.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 24 jam

Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa hasil terdistribusi normal dengan nilai p = 0,433 (p>0,05).

Hasil uji statistik *one way* ANOVA (Tabel I) menunjukkan p = 0,002 (p<0,05), hal ini berarti bahwa kelompok kontrol maupun perlakuan memiliki proliferasi limfosit yang berbeda bermakna.

Terdapat perbedaan yang bermakna (p<0,05) antara kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB) terhadap kelompok madu hutan dosis 0,54 mL/200 g BB (Tabel II). Namun, terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB) terhadap kelompok madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB dan kelompok madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB. Pada Tabel III menunjukkan peningkatan proliferasi limfosit pada madu hutan dosis 0,54 mL/200 g BB sebesar 13,99%. Pada madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB sebesar 3,497% dan madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB sebesar 7,23% menunjukkan penurunan proliferasi limfosit. Berdasarkan hasil analisis tersebut dapat dibuktikan bahwa pemberian madu hutan pada dosis 0,54 mL/200 g BB berpengaruh terhadap proliferasi limfosit yaitu berupa peningkatan proliferasi limfosit.

Pada madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB dan dosis 1,08 mL/200 g BB, secara uji statistik menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna terhadap kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB). Pada kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB)

Tabel I. Hasil Rerata *Optical Density* (OD) Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 24 jam

Kelompok	n	Rata-rata OD ± SD	*p*
Akuades 2,5 mL/200 g BB	5	0,429 ± 0,032	0,002(b)
Dosis 0,27 mL/200 g BB	5	0,414 ± 0,040	
Dosis 0,54 mL/200 g BB	5	0,489 ± 0,060	
Dosis 1,08 mL/200 g BB	5	0,460 ± 0,072	

Keterangan: b : berbeda signifikan (p<0,05).

Tabel II. Hasil Analisis Tukey Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 24 jam

Kelompok	Kontrol	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Kontrol	-	0,886	0,020b	0,394
Dosis 1	0,886	-	0,002b	0,107
Dosis 2	0,020b	0,002b	-	0,490
Dosis 3	0,394	0,107	0,490	-

Keterangan:
Kontrol : akuades 2,5 mL/200 g BB
Dosis 1 : madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB
Dosis 2 : madu hutan dosis 0,54 mL/200 g BB
Dosis 3 : madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB
b : berbeda signifikan (p<0,05)

Tabel III. Persentase Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 24 jam

Kelompok	24 jam
Dosis madu hutan 0,27 mL/200 g BB	-3,497%
Dosis madu hutan 0,54 mL/200 g BB	13,99%
Dosis madu hutan 1,08 mL/200 g BB	7,23%

Tabel IV. Hasil Rerata-rata OD Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 48 jam

Kelompok	n	Rata-rata OD ± SD	*p*
Akuades 2,5 mL/200 g BB	5	0,366 ± 0,019	
Dosis 0,27 mL/200 g BB	5	0,361 ± 0,053	0,000 (b)
Dosis 0,54 mL/200 g BB	5	0,432 ± 0,065	
Dosis 1,08 mL/200 g BB	5	0,432 ± 0,067	

Keterangan: b : berbeda signifikan ($p<0,05$).

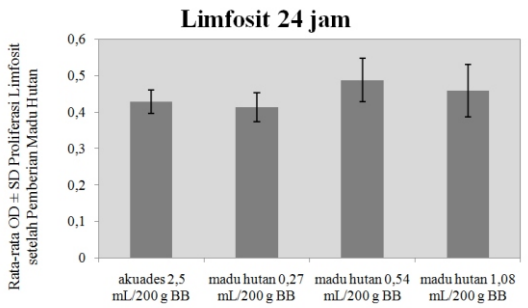
Tabel V. Hasil Analisis Tukey Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 48 jam

Kelompok	Kontrol	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Kontrol	-	0,996	$0,014^b$	$0,014^b$
Dosis 1	0,996	-	$0,008^b$	$0,008^b$
Dosis 2	$0,014^b$	$0,008^b$	-	1,000
Dosis 3	$0,014^b$	$0,008^b$	1,000	-

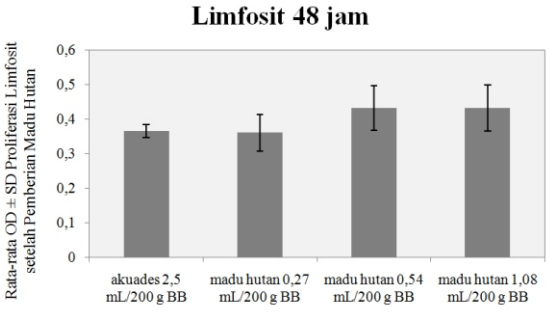
Keterangan:
Kontrol : akuades 2,5 mL/200 g BB
Dosis 1 : madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB
Dosis 2 : madu hutan dosis 0,54 mL/200 g BB
Dosis 3 : madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB
b : berbeda signifikan ($p<0,05$)

Tabel VI. Persentase Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 48 jam

Kelompok	48 jam
Dosis madu hutan 0,27 mL/200 g BB	-1,366%
Dosis madu hutan 0,54 mL/200 g BB	18,03%
Dosis madu hutan 1,08 mL/200 g BB	18,03%



Gambar 1. Histogram Hasil Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 24 jam



Gambar 2. Histogram Hasil Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 48 jam

menunjukkan peningkatan proliferasi limfosit dibanding kelompok madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB. Hal ini bisa disebabkan karena saat antigen dipejankan ke tubuh tikus sistem imun bawaan yang responnya cepat dan relatif non spesifik akan memberikan pertahanan awal, sehingga akan meningkatkan proliferasi limfosit pada kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB). Berdasarkan hasil penelitian maka dapat dibuktikan bahwa madu hutan pada dosis kedua (0,54 mL/200 g BB) memiliki efek imunomodulator terhadap proliferasi limfosit.

3.2. Pengukuran Proliferasi Limfosit setelah Pemberian Madu Hutan pada Inkubasi 48 jam

Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dengan nilai p = 0,735 (p>0,05).

Hasil uji statistik *one way* ANOVA (Tabel IV) menunjukkan nilai p = 0,000 (p<0,05), hal ini berarti bahwa kelompok kontrol maupun perlakuan memiliki proliferasi limfosit yang berbeda bermakna.

Terdapat perbedaan yang bermakna (p<0,05) antara kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB) terhadap kelompok madu hutan dosis 0,54 mL/200 g BB dan kelompok madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB (Tabel V). Namun, terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB) terhadap kelompok madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB. Pada Tabel VI menunjukkan peningkatan proliferasi limfosit pada madu hutan dosis 0,54 mL/200 g BB dan madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB sebesar 18,03% dan 18,03%. Pada madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB sebesar 1,366% menunjukkan penurunan proliferasi limfosit. Berdasarkan hasil analisis tersebut dapat dibuktikan bahwa pemberian madu hutan pada dosis 0,54 mL/200 g BB dan pemberian madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB berpengaruh terhadap proliferasi limfosit, yaitu berupa peningkatan proliferasi limfosit.

Pada kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB) menunjukkan peningkatan proliferasi limfosit dibanding kelompok madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB. Hal ini bisa disebabkan karena saat antigen dipejankan ke tubuh tikus sistem imun bawaan yang responnya cepat dan relatif non spesifik akan memberikan pertahanan awal, sehingga akan meningkatkan proliferasi limfosit pada kelompok kontrol negatif (akuades 2,5 mL/200 g BB). Berdasarkan rata-rata proliferasi limfosit setelah pemberian madu hutan (Gambar 2) pada kelompok madu hutan dosis 0,27 mL/200 g BB terdapat penurunan proliferasi limfosit dibanding kelompok madu hutan dosis 0,54 mL/200 g BB dan dosis 1,08 mL/200 g BB.

Pada tahap ini pengujian proliferasi limfosit di inkubasi selama 24 jam dan 48 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dosis madu hutan pada tiap waktu inkubasi memberikan efek yang sama terhadap kultur sel limfosit, yaitu sel limfosit menurun seiring dengan lamanya inkubasi. Pemberian dosis madu hutan 0,54 mL/200 g BB dan madu hutan dosis 1,08 mL/200 g BB menunjukkan peningkatan proliferasi limfosit dibanding kontrol negatif (2,5 mL/200 g BB). Menurut Bellanti (1993) hal ini dapat disebabkan karena adanya rangsangan dari antigen dalam jumlah yang optimal. Selain itu menurut penelitian Jiao *et al*., (2003), disebutkan bahwa senyawa flavonoid meningkatkan aktivitas IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit. Hal inilah yang mungkin menyebabkan peningkatan proliferasi limfosit pada kelompok madu hutan 0,54 mL/200 g BB dan kelompok madu hutan 1,08 mL/200 g BB dibanding kelompok kontrol negatif (2,5 mL/200 g BB).

Menurut Pinchuk (2002) limfosit yang aktif menghasilkan limfokin dan IL-2 yang berfungsi memicu proliferasi limfosit. IL-2 juga berfungsi sebagai sitotoksik sel T dan merangsang produksi IFN. IL-2 diproduksi oleh sel T *helper* dan dapat dirangsang produksinya dengan pemberian imunomodulator. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Wijayanti (2005) bahwa

penambahan bahan yang bersifat imunomodulator akan meningkatkan respon pada limfosit dan menyebabkan pembelahan sel sehingga terjadi proliferasi.

Hasil penelitian terhadap proliferasi limfosit ini semakin menegaskan bahwa mengkonsumsi madu hutan dapat memberi efek imunomodulator karena dapat meningkatkan proliferasi limfosit dengan dosis 0,54 dan 1,08 mL/200 g BB.

4. Kesimpulan

Pemberian madu hutan berpengaruh terhadap proliferasi limfosit pada hewan uji tikus jantan galur *Wistar* berupa peningkatan proliferasi limfosit yang signifikan ($p<0,05$) dibanding kontrol negatif.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan banyak terima kasih kepada Kepala LPPT UGM dan Balkes Yogyakarta: Bu Istini, Pak Sutari dan Bu Wardani atas semua bantuan teknis yang telah diberikan.

Daftar Pustaka

Asari, 2009. *Efek Pemberian Madu Terhadap Kerusakan Sel Hepar Mencit (Mus musculus) akibat paparan parasetamol. Skripsi*, 6. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Bellanti, 1993, *Imunologi III*, Penerjemah: A. Samik Wahab, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Haryanto, 2009, *Penggunaan madu dalam perawatan luka*, http://io.Ppijepang.Org/new/files/edisi/files_inovasi_Vol.15_XXI_NOV_2009, pdf # page = 38, diakses tanggal 11 November 2011.

Jiao, Y., Wen, J., and Yux, 2003. *Influence of Flavonoid, of Astragalus membranaceus's stam and leaves on the function of cell mediated immunity in mice*, Available at: URL: http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed, diakses tanggal 25 Mei 2012.

Pinchuk, G., 2002, *Theory and Problems of Immunology.* McGraw-Hill Companies inc., New York.

Roitt, I., 1997, *Essential Immunology*. 9th Edition, Blackwell Scientific Publications, London, pp.26.

Saifulhaq, 2006. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa Dosis Bertingkat Terhadap Proliferasi Limfosit Lien Pada Mencit BALB/C. Skripsi*, 4, Universitas Diponegoro, Semarang.

Wahyuniari, I., 2009. *Minyak Buah Merah Meningkatkan Aktivitas Proliferasi Limfosit Limpa Mencit setelah Infeksi Listeria monocytogenes. Jurnal Veteriner*, 144-145.

Wijayanti, L., 2005. *Aktivitas proliferasi limfosit setelah imunisasi intranasal protein terlarut Toxoplasma selama infeksi Toxoplasma gondii. Biosmart* 7 (1), 9-13.