

MIKROANATOMI LIMPA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus* L.) SETELAH PEMBERIAN ASAM HUMAT DARI TANAH GAMBUT KALIMANTAN

Diah Wulandari Rousdy^{1*}, Rahmawati¹, Rikhsan Kurniatuhadi¹, Edi Kurniadi¹

¹Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak,

* Email: diah.w.rousdy@gmail.com

Diterima : 17 Juni 2016, Diterima setelah perbaikan : 22 Juni 2017

Abstract. Peat soil is organic soil types that has various biological potential to be developed. Humic acid compounds in the peat soil have a variety of potential biological one as immunostimulant. The aimed of this study to determine the effect of humic acid extracted from peat soil spleen histology Kalimantan against white male rats (*Rattus novergicus* L.) strain Wistar. Peat soil samples were taken in Pontianak on sapis maturity level. Humic acid is separated from other humic substances using IHSS methode. This research was done by completely randomized design with 4 treatments ie positive control (isoprinosin 380,3 mg/kg), humic acid 125; 250; 500 mg / kg body weight. Humic acid was administrated by oral gavage for 10 days. After 10 days, spleen organ was taken to preparat by paraffin methode and hematoxilin-eosin staining. Humic acid administration of 125 mg/kg showed a larger diameter than the white pulp isoprinosin control. However, humic acid administration of 500 mg/kg caused the excess stimulation of white pulp of the spleen congestion symptoms characterized by disarrangement of lymphocytes cluster. There are no significant different of spleen weight between all treatments.

Keywords: *Humic acid; Immunostimulant; Spleen, Peat Soil*

Abstrak. Tanah gambut merupakan jenis tanah organik yang memiliki berbagai potensi biologi untuk dikembangkan. Senyawa asam humat dalam tanah gambut diduga mempunyai berbagai potensi biologis salah satunya sebagai imunostimulan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian asam humat yang diekstraksi dari tanah gambut Kalimantan terhadap histologi limpa tikus putih jantan (*Rattus novergicus* L.) galur Wistar. Sampel tanah gambut diambil di Pontianak pada tingkat kematangan sapis. Asam humat dipisahkan dari substansi humat lainnya menggunakan metode International Humic Substances Society (IHSS). Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan yakni kontrol positif (isoprinosin 380,3 mg/kg), asam humat 125; 250; 500 mg/kg berat badan. Pemberian asam humat dilakukan secara oral selama 10 hari. Hasil menunjukkan bahwa pemberian asam humat 125 mg/kg menunjukkan diameter pulpa putih lebih besar dibandingkan kontrol isoprinosin. Namun pemberian asam humat 500 mg/kg menyebabkan terjadinya stimulasi berlebih berupa gejala kongesti pulpa putih limpa yang ditandai dengan susunan limfosit yang tidak rapat. Semua perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap berat limpa.

Kata kunci: asam humat, imunostimulan, limpa, tanah gambut

PENDAHULUAN

Gambut terbentuk dari bahan organik yang tertimbun secara alami dalam keadaan basah berlebih, tidak padat dan hanya mengalami sedikit dekomposisi. Tanah gambut di Indonesia sebagian besar tersebar di tiga pulau utama yakni Pulau Kalimantan, Sumatera dan Papua (Noor, 2001), karakteristik kimia yang paling khas dari tanah gambut adalah tingginya kandungan humus atau bahan organik tanah. Humus dalam tanah gambut terbagi menjadi tiga komponen utama yakni asam humat, asam fulvat dan hemin. Asam humat merupakan substansi humus yang paling dominan menyusun gambut.

Struktur molekul asam humat dari tanah gambut tropis seperti di Indonesia berbeda dengan tanah gambut subtropis yang telah banyak diteliti (Orlov, 1995; Stevenson, 1994). Perbedaan struktur kimia asam humat dipengaruhi oleh faktor pembentuk humus seperti tipe vegetasi, musim dan topografi. Perbedaan dalam bentuk molekul ini juga mengindikasikan perbedaan fungsi biologis dari asam humat.

Manfaat asam humat telah dilaporkan sebagai antibakteri, antivirus, antitumor, meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan hewan ternak dan berpotensi sebagai imunostimulan (Agazzi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2003; Kodama & Denso, 2007; Kodama *et al.*, 2008; Tohid *et al.*, 2010). Pengujian asam humat secara *in vitro* menunjukkan potensi antioksidan atau kemampuan menangkap radikal bebas disebabkan oleh banyaknya gugus oksigen reaktif seperti karboksil, hidroksil dan keton (Vašková *et al.*, 2011).

Respon fisiologis lain yang telah diteliti dari pemberian asam humat adalah stimulasi sistem imunitas, sehingga asam humat berpotensi sebagai imunostimulan. Hal ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2003) menggunakan kultur sel endothelium vena umbilikal manusia. Pemberian asam humat 50 µg/mL mampu menstimulasi kemampuan adhesi neutrofil hingga 100%, sedangkan pada konsentrasi humat 3 µg/mL menstimulus neutrofil hingga 200%.

Salah satu organ yang berperan dalam sistem imunitas tubuh adalah limpa. Limpa berfungsi sebagai tempat menyaring darah dari berbagai antigen atau patogen asing. Bagian parenkim limpa terdapat *germinal center* yang merupakan tempat berkumpulnya sel limfosit. Diameter *germinal center* dipengaruhi oleh tingkat proliferasi sel limfosit B (Bellanti, 1993), sehingga peningkatan diameter *germinal center* akan sejalan dengan peningkatan imunitas spesifik. Berdasarkan landasan tersebut maka penelitian bertujuan mengetahui pengaruh pemberian asam humat terhadap mikroanatomi limpa tikus putih.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: larutan NaOH 0,1M, larutan HCl 6M, akuades, isoprinosine, etanol, xylol, parafin, canada balsam, hematoksilin dan eosin, klorofom dan larutan *phospate buffer saline* (PBS) steril. Peralatan utama yang digunakan dalam penelitian antara lain: peralatan bedah, mikrotom, *staining jar*, mikrotom putar dan mikroskop.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus* L.) galur Wistar berumur dua bulan yang diaklimasikan selama dua minggu di laboratorium. Pemberian pakan dan minum dilakukan secara *ad libitum*. Sampel tanah gambut diambil di Pontianak pada kedalaman 30 cm dari permukaan tanah. Sampel tanah gambut dianalisis jenis dan tingkat kematangannya di Laboratorium Fisika dan Kesuburan Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan empat perlakuan dan tiga replikasi. Perlakuan dosis asam humat dilakukan secara oral selama 10 hari yang terdiri dari kontrol positif (isoprinosin 380,3 mg/kg BB tikus) dan dosis asam humat (125; 250; 500 mg/kg BB tikus). Setelah 10 hari pemberian oral, tikus dibedah dan organ limpa diambil untuk dibuat preparat.

Ekstraksi asam humat mengacu pada metode IHSS (2012) yakni berdasarkan pengendapan dalam asam kuat dan kelarutan dalam basa lemah. Tanah gambut dilarutkan dengan 0,1 M NaOH 400 mL selama 4 jam sambil dikocok menggunakan *shaker*. Campuran dibiarkan selama satu malam. Filtrat disaring beberapa kali dengan kapas dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Supernatan diendapkan dengan larutan asam kuat 6 M HCl kemudian didiamkan satu malam. Filtrat disentrifugasi kembali beberapa kali sehingga asam humat terpisah sempurna dari asam fulvat. Asam humat kemudian dibuat dalam berbagai konsentrasi perlakuan yang berbeda.

Tikus kemudian dibius dengan kloroform dan dibedah. Limpa yang berada dalam rongga abdomen sebelah kiri dan berwarna merah kehitaman diambil dan dicuci dalam larutan PBS. Limpa ditimbang dengan timbangan analitik untuk mengetahui bobotnya. Histologi organ limpa dibuat dengan metode irisan paraffin dan pewarnaan metode hematoksilin eosin (HE).

Organ limpa difiksasi dengan formalin 10%, kemudian dehidrasi dengan alkohol bertingkat 30%-100%. Kemudian dijernihkan dengan xilol selama 24 jam. Jaringan yang telah jernih diinfiltrasi dengan parafin yang dilakukan dalam oven 70°C untuk kemudian dibuat menjadi blok parafin.

Jaringan diiris dengan mikrotom pada ketebalan 6-8 µm dan diwarnai dengan metode pewarnaan hematoksilin-eosin (Gunarso, 1989). Masing-masing preparat diamati tiga pulpa putih. Pengukuran diameter pulpa putih dilakukan menggunakan mikrometer.

Data diameter pulpa putih dan berat organ limpa dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menggunakan SPSS versi 15. Data ditampilkan dalam bentuk gambar irisan limpa dan nilai rerata ± standar deviasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan Asam Humat

Sampling tanah gambut dilakukan di kota Pontianak pada kedalaman 30 cm dari permukaan tanah. Tingkat kematangan tanah gambut dianalisis dengan metode Von Post dan diperoleh hasil tanah gambut yang disampling berada pada jenis sapris (Gambar

1A). Gambut sapris merupakan gambut yang sudah mengalami perombakan lanjut dan bersifat matang. Menurut Noor (2001) tipe gambut sapris terdapat pada jeluk dangkal, sukar terperas, berwarna hitam dan hampir tidak berserat.

Tanah gambut kering diekstrak menggunakan metode IHSS (IHSS, 2012) yakni berdasarkan kelarutan dalam basa dan asam. Tanah dicampur dengan larutan NaOH 0,1 M. Setelah pencampuran tampak asam humat terlarut dalam NaOH berwarna

hitam pekat. Fraksi humat ditambah HCl 6 M dan didiamkan semalam untuk memisahkan fraksi asam fulvat dari asam humat. Menurut Stevenson (1994), asam humat akan mengendap dalam suasana asam dan terlarut dalam suasana basa. Hasil penambahan asam akan terbentuk 2 fase, asam humat berwarna hitam pekat tampak mengendap di bagian dasar sedangkan asam fulvat berupa cairan bening kecoklatan berada dibagian atas (Gambar 1B).



Gambar 1. Tanah gambut kering (A), Hasil pemisahan asam humat dan asam fulvat (B)

Histologi Limpa

Pengamatan pada makroanatomi limpa diperoleh gambaran limpa normal untuk kelompok perlakuan asam humat yakni limpa berbentuk seperti sepatu dan berwarna merah cerah (Gambar 2).



Gambar 2. Organ limpa

Pada permukaan limpa tidak menunjukkan nodul limfoid atau pulpa putih yang membesar. Limpa normal juga memperlihatkan gambaran bagian tepi limpa yang rata. Warna merah pada limpa disebabkan banyaknya vaskularisasi pembuluh darah menuju bagian hilus pada limpa.

Bobot limpa menunjukkan pemberian asam humat tidak memberikan perbedaan dengan kontrol positif (Tabel 1). Bobot limpa paling besar diberikan oleh perlakuan asam humat 500 mg/kg dan bobot limpa paling kecil diberikan oleh perlakuan asam humat 250 mg/kg. Tidak ada perbedaan bermakna antar perlakuan.

Jaringan limpa tikus putih khususnya bagian pulpa putih menunjukkan pembesaran setelah pemberian asam humat. Berdasarkan hasil pengamatan pada preparat limpa, diperoleh diameter pulpa putih pada perlakuan asam humat 125 mg/kg memberikan diameter paling besar yakni 0,319 mm dibandingkan perlakuan asam humat lainnya dan isoprinosin (Tabel 1). Kontrol positif isoprinosin memberikan diameter pulpa paling kecil yakni 0,236 mm. Secara umum tidak terlihat hubungan tara berat limpa dengan diameter pulpa putih.

Tabel 1. Bobot limpa dan diameter pulpa putih setelah perlakuan asam humat

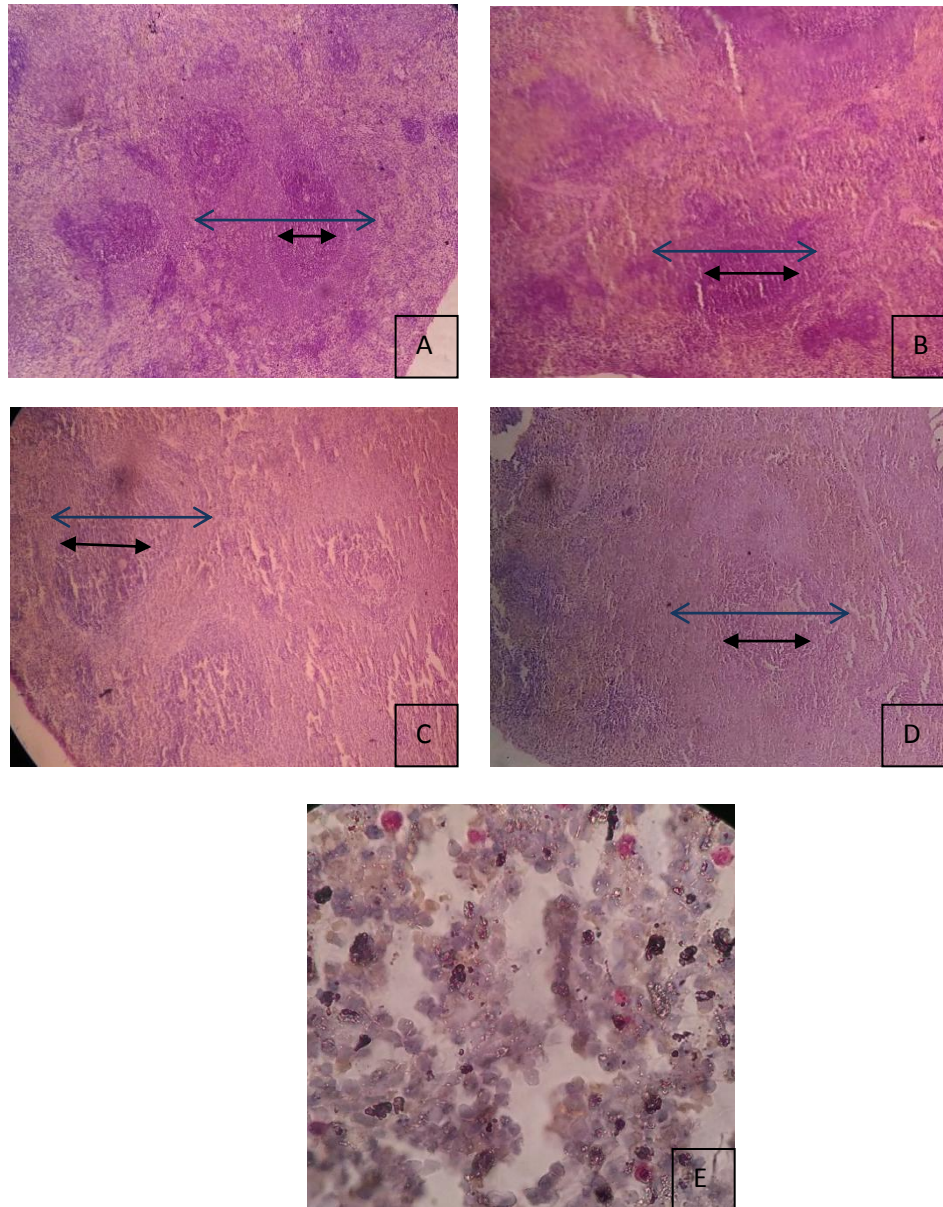
Perlakuan	Bobot limpa (g)	Diameter Pulpa putih (mm, n=16)
Kontrol positif	0,602 ±	0,236 ±
isoprinosin	0,178 ^a	0,001
Asam humat 125 mg/kg	0,578 ±	0,319 ±
	0,191 ^a	0,016
Asam humat 250 mg/kg	0,480 ±	0,275 ±
	0,082 ^a	0,028
Asam humat 500 mg/kg	0,692 ±	0,253 ±
	0,135 ^a	0,011

Data ditampilkan dalam nilai rerata ± standar deviasi. Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ($P < 0,05$)

Tampilan histologi limpa tikus menunjukkan di dalam pulpa putih terdapat *germinal center* yang merupakan pusat proliferasi atau pembelahan sel limfosit sehingga sel limfosit tersusun lebih rapat. *Germinal center* pada preparat terpulas lebih gelap dan ditemukan pembuluh darah arteri centralis pada bagian tepi *germinal center*. Perlakuan asam humat dosis rendah 125 mg/kg dan 250 mg/kg memberikan susunan sel limfosit yang sangat rapat pada bagian

pulpa putih dan *germinal center* (Gambar 3A dan 3B).

Gambaran histologi yang sedikit berbeda ditemukan pada perlakuan asam humat dosis tinggi 500 mg/kg dan perlakuan kontrol isoprinisin. Susunan limfosit pada pulpa putih dan *germinal center* sedikit merenggang dan tidak rapat (Gambar 3C). Kemungkinan terjadi overstimulasi limpa yang ditandai dengan hiperplasia atau pembengkakan jaringan.



Gambar 3. Histologi limpa perlakuan asam humat 125 mg/kg (a), asam humat 250 mg/kg (b), asam humat 500 mg/kg (c), kontrol isoprinisin (d). Perbesaran 100x. Pulpa putih limpa perbesaran 400x .
Ket: garis biru menunjukkan pulpa putih, garis hitam menunjukkan *germinal center*.

Asam humat merupakan substansi humat yang terkandung dalam tanah gambut dan berpotensi sebagai imunostimulan. Berdasarkan penelitian Rousdy *et al.* (2016) menemukan bahwa pemberian secara oral asam humat dari tanah gambut terhadap tikus putih Wistar mampu menstimulus sistem imunitas melalui peningkatan aktivitas fagositosis dan peningkatan jumlah leukosit. Salah satu organ dalam sistem limfoid yang berperan sebagai tempat maturasi limfosit adalah limpa.

Secara makroanatomi, organ limpa tampak berwarna hitam kemerahan. Hal ini disebabkan aliran darah menuju limpa sangat besar. Fungsi utama limpa adalah menyaring antigen asing berupa

mikroorganisme yang ditemukan dalam darah. Berdasarkan hasil penelitian berat limpa antar perlakuan secara umum tidak berbeda signifikan. Meski terdapat kecenderungan perlakuan isoprinisin dan asam humat dosis tertinggi 500 mg/kg memberikan berat limpa paling besar. (Tabel 1). Menurut Sherwood (2007), bobot suatu organ berhubungan langsung dengan fungsi metabolisme yang dilakukan, faktor usia dan jenis kelamin. Pembesaran organ limpa pada perlakuan asam humat 500 mg/kg diduga terjadi overstimulasi limpa sehingga produksi limfosit dan vaskularisasi menuju limpa menjadi sangat besar.

Bagian dalam parenkim limpa terdiri dari pulpa putih dan pulpa merah. Dalam pulpa putih ditemukan

germinal center yang berperan sebagai tempat proliferasi dan pematangan sel limfosit (Junquiera & Carneiro, 2000). Pulpa putih tampak terpisah dari pulpa merah disekelilingnya oleh zona marginal yang berisi pembuluh darah. Penyusun pulpa merah berupa jaringan ikat retikulin, limfosit B, limfosit T, sel plasma dan banyak sel darah serta sinusoid (Junquiera & Carneiro, 2004).

Pemaparan antigen dari sel penyaji antigen atau fagosit kepada sel limfosit terjadi dalam pulpa putih. Pulpa putih tampak berupa nodul limfoid atau kumpulan sel limfosit yang menyelubungi arteri sentralis, terutama jenis limfosit T. Pulpa putih pada kondisi normal berisi kumpulan sel limfosit yang tersusun rapat. Sel-sel limfosit B (55%) lebih banyak ditemukan dalam organ limpa dibandingkan limfosit T (45%). Limfosit B berperan memproduksi antibodi sedangkan limfosit T berperan dalam imunitas seluler (Janeway, 2001).

Namun demikian, tampilan histologi dari pulpa putih limpa yang sedikit berbeda ditunjukkan oleh pemberian asam humat dosis tinggi yakni 500 mg/kg serta pemberian isoprinosin sebagai imunostimulan standar. Pada kedua perlakuan tersebut tampak terjadi kongesti atau pelebaran jaringan yang ditandai dengan susunan limfosit yang tidak rapat di bagian germinal center. Kongesti jaringan limpa dapat terjadi karena reaksi antara antigen dengan limfosit (Matheos dkk, 2013). Antigen yang masuk ke dalam darah bisa berupa mikroorganisme atau senyawa kimia lainnya.

Pada penelitian ini, kongesti jaringan limpa dapat terjadi karena pemberian asam humat dosis tinggi sehingga memicu secara berlebihan pelepasan sitokin. Sitokin merupakan peptida pengatur (regulator) yang dapat diproduksi oleh hampir semua jenis sel berinti dalam tubuh. Menurut Davies (1997) dan Janeway (2001), sitokin jenis interleukin merupakan sitokin utama yang berperan dalam komunikasi interseluler leukosit.

Pemberian imunostimulan asam humat diduga berpengaruh terhadap diameter pulpa putih limpa melalui regulasi sitokin. Joone *et al.* (2003) dan Junek *et al.* (2009) melaporkan konsentrasi asam humat 10-100 µg/mL dapat meningkatkan pelepasan TNF-α dan produksi sitokin pada konsentrasi humat 80 µg/mL. Stimulus pelepasan sitokin juga dilaporkan oleh Vetvitcka *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa penggunaan asam humat bersama imunostimulan glukon (rasio 1:1) dapat menstimulus secara optimal sekresi enam jenis sitokin yakni IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, dan MPC-1.

Menurut van Rensburgh *et al.* (2009), pengujian asam humat secara *in vitro* akan menstimulus produksi interleukin IL-2 yang berperan dalam proliferasi limfosit. Sitokin merupakan protein dengan berat molekul kecil yang berperan besar dalam komunikasi seluler sel leukosit. Pelepasan sitokin erat kaitannya dengan proliferasi limfosit. Sekresi IL-2 dan IL-15 berfungsi menstimulus proliferasi sel limfosit T sedangkan IL-7 dan IL-13 berfungsi menstimulus pertumbuhan dan perkembangan limfosit B (Janeway, 2001). Pelepasan sitokin secara langsung dipengaruhi oleh hormon kortisol dengan jalur pengaturan hipotalamus-hipofisis-adrenal. Hal ini mengindikasikan adanya intervensi dari sistem endokrin pada organ limfoid.

Proses proliferasi dan pematangan limfosit terjadi dalam *germinal center* yang berada dalam pulpa putih. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa

peningkatan jumlah limfosit pada perlakuan asam humat berhubungan dengan proliferasi limfosit yang terjadi dalam pulpa putih limpa.

PENUTUP

Kesimpulan Dan Saran

Pemberian asam humat dari tanah gambut menunjukkan kecenderungan meningkatkan sistem imunitas melalui peningkatan diameter pulpa putih, meski uji statistika tidak signifikan ($P > 0,05$). Asam humat dosis 125 mg/kg memberikan diameter pulpa putih limpa paling besar dibandingkan kontrol positif isoprinosin. Namun pemberian asam humat dosis tinggi 500 mg/kg menimbulkan kongesti pulpa putih akibat stimulasi yang berlebihan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agazzi, A., Cigalino, G., Mancini, G., Savoini, G. & Dell'Orto, V. (2007). Effects of Dietary Humates on Growth and An Aspect of Cell-mediated Immune Response in Newborn Kids. *Small Ruminant Research* 72:242–245.
- Bellanti dan Herberman (1993) Mekanisme Pertahanan Imun pada Imunitas Tumor. cit. *Imunologi III*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Chen C, Liu J, Lu F, Yang M, Lee Y, Huang T. (2003). The Effect of Humic Acid on The Adhesibility of Neutrophils. *Thrombosis Research* 108: 67–76.
- Davies H. (1997). *Introductory Immunobiology*. Chapman and Hall. London
- Gunarso W. (1989). *Mikroteknik*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Studi Ilmu Hayati, IPB. Bogor.
- International Humic Substances Society. (2012). *Isolation of IHSS Soil Fulvic and Humic Acids*. (www.humicsubstances.org).
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. (2001). *Immunobiology*. Garland Publishing
- Joone, K.T., Dekker, J. & van Rensburg, C.E.J. (2003). Investigation of Immunostimulatory Properties of Oxihumate. *Naturforsch* 58: 263–267.
- Junek, R., Morrow, R., Schoenherr, J., Schubert, R., Kallmeyer, R., Phull, S. & Klocking, R. (2009). Bimodal Effect of Humic Acids on The LPS-induced TNF-α Release from Differentiated U937 cells. *Phytomedicine* 16: 470–476.
- Junquiera LC. Dan Carneiro J. (2003). *Histologi Dasar: Teks dan Atlas*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kodama, H & Denso. (2007). Antitumor Effect of Humus Extract on Murine Transplantable L1210 Leukimia. *Journal Veterinary Medical Science* 69: 1069-1071.
- Kodama, K., Denso, Okazaki, F. & Ishida, S. (2008). Protective Effect of Humus Extract Against *Trypanosoma brucei* Infection in Mice. *Journal Veterinary Medical Science* 70: 1185-1190.
- Matheos C, Lintong P, Kairupan C. (2013). *Gambaran Histologik Jaringan Limpa Tikus*

- Putih (*Rattus novergicus*) Yang Diinfeksi *Escherichia coli* dan Diberi Madu. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, 1(2): 961-965
- Noor, M. (2001). *Pertanian Lahan Gambut, Potensi dan Kendala*. Penerbit Kanisius. Jakarta.
- Rousdy DW., Rahmawati, Kurniatuhadi R. (2016). Immune Responses of Wistar Rat (*Rattus novergicus*) on Adduction of Humic Acid from Borneo Peat Soil. *Biosaintifika Journal of Biology & Biology Education*. 8(3)
- Sherwood L. (2007). *Human Physiology From Cells to Systems*. Brooks Publishing. USA
- Stevenson FJ. (1994). *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reaction*. John Willey & Sons Inc.
- Tohid, T., Hasan, G. & Alireza, T. (2010). Efficacy of Mannanligosaccharides and Humate on Immune Response to Avian Influenza (H9) Disease Vaccination in Broiler Chickens. *Veterinary Research Community* 34: 709–717.
- Van Rensburgh CEJ dan Naude PJ. (2009). Potassium Humate Inhibits Complement Activation and the Production of Inflammatory Cytokines In Vitro. *Inflammation* 32(4): 270-276
- Vašková, J., Veliká, B., Pilátová, M., Kron, I. & Vaško, L. (2011). Effects of Humic Acids in vitro. *Cell Developmental Biology* 47:376–382
- Vetvicka, V., Baigorri, R., Zamarreio, A.M., Garcia-Mina, J.M. & Yvin, J. (2010). Glucan and Humic Acid: Synergistic Effects on the Immune System. *Journal of Medicinal Food*. 13:863-869.