

615.324324

SuH

p c1

**PENGARUH JUS *Aloe vera* TERHADAP
KEMAMPUAN FAGOSITOSIS MAKROFAG
DAN PRODUKSI *NITRIC OXIDE* MENCIT
BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella*
*typhimurium***

**The effects of *Aloe vera* juice on the macrophages
phagocytosis activity and nitric oxide production of
Salmonella typhimurium infected BALB/C mice**



TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**S U H A R N I
G4A002033**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
DESEMBER 2004**

**PENGARUH JUS *Aloe vera* TERHADAP
KEMAMPUAN FAGOSITOSIS MAKROFAG
DAN PRODUKSI *NITRIC OXIDE* MENCIT
BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella*
*typhimurium***

**The effects of *Aloe vera* juice on the macrophages
phagocytosis activity and nitric oxide production of
Salmonella typhimurium infected BALB/C mice**



TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**S U H A R N I
G4A002033**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
DESEMBER 2004**

TESIS

PENGARUH JUS *Aloe vera* TERHADAP KEMAMPUAN FAGOSITOSIS MAKROFAG DAN PRODUKSI *NITRIC OXIDE* MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium*

Disusun Oleh

SUHARNI
G4A002033

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji
Pada Tanggal 24 Desember 2004
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

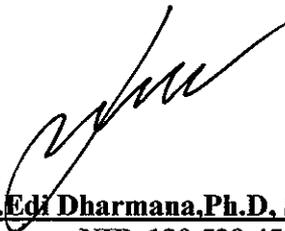
Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota



Prof. Dr. dr. H. Tjahjono, Sp.PA(K), FIAC
NIP. 130 368 076



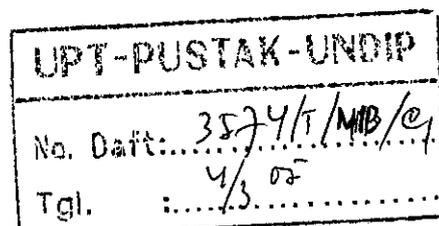
dr. Edi Dharmana, Ph.D, Sp.Par(K)
NIP. 130 529 451

Mengetahui :

**Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Pascasarjana Universitas Diponegoro**



Prof. dr. H. Soebowo, Sp.PA (K)
NIP. 130 352 249



PERYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar kepustakaan.

Semarang, Desember 2004

SUHARNI

KATA PENGANTAR

Puji syukur yang amat dalam penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena dengan rahmat, anugerah dan berkah-Nya, penulisan tesis dengan judul “Pengaruh Pemberian Jus *Aloe vera* Terhadap Kemampuan Fagositosis Makrofag Dan Produksi *Nitric Oxide* Mencit BALB/C Yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*” dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada :

1. Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan pada penulis untuk meningkatkan ilmu pengetahuan.
2. Prof.dr.H.Soebowo Sp.PA.(K), Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana UNDIP beserta seluruh staff dari berbagai disiplin keilmuannya yang telah membimbing dan membuka cakrawala baru berpikir selama penulis menimba ilmu di Biomedik.
3. Prof.Dr.dr.H.Tjahjono, Sp PA(K), FIAC dan dr.Edi Dharmana MSc.PhD. Sp.Par.K selaku pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pengarahan.
4. Tim penguji proposal, yang telah memberikan masukan-masukan yang sangat berharga.
5. Dr.Hj.Neni S, MSi, konsultan penelitian di bidang imunologi, yang telah banyak membimbing dan berbagi ilmu pengetahuan, teknik laboratorium selama melakukan penelitian.
6. Direktur dan staff Laboratorium : Bioteknologi, Biokimia, Mikrobiologi, GAKI Fakultas Kedokteran UNDIP dan Laboratorium Ilmu Hayati UGM, yang telah memberikan kesempatan untuk memanfaatkan fasilitas laboratorium dalam pelaksanaan penelitian tesis ini, serta rekan-rekan Biomedik, Mbak Ike, Mbak Nata, Pak Doel, dan semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama pendidikan dan penelitian hingga selesainya tesis ini.

Akhir kata dengan segala kerendahan hati dan rasa hormat yang mendalam, penulis ucapkan terima kasih kepada Ayah dan Ibunda tercinta, Mamanda Ramli Rj Intan, Kakanda, Ni wik dan seluruh keluarga besar, atas doanya, semangat, dorongan untuk terus maju. Semoga Allah SWT memberikan balasan dan karunia yang tak terbatas, amien. Semoga tesis ini bermanfaat dan dapat menambah pengetahuan bagi yang membutuhkannya.

Semarang, Desember 2004

SUHARNI

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Suharni S.Si
Tempat/Tanggal lahir : Padang, 15 Oktober 1976
Jenis Kelamin : Perempuan
Status : Belum menikah

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. SD Negeri 02 Padang 1982-1988
2. SMP Negeri 14 Padang 1988-1991
3. SMA Negeri 9 Padang 1991-1994
4. Biologi FMIPA, Universitas Andalas Padang 1994-1999
5. Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP 2002-2004

RIWAYAT PEKERJAAN

1. Asisten Dosen, Bagian Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA dan Jurusan Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Universitas Andalas Padang (1999-2001).
2. *Research staff*, "Isolations and activity tests of Protease Enzyme in certain area in West Sumatera," Funded by *Due Like Project* / World Bank, 1999/2000.

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Halaman Pernyataan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Riwayat Hidup.....	vi
Daftar Isi.....	vii
Daftar Tabel.....	x
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Lampiran.....	xii
Abstrak.....	xiii
Abstract.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Makrofag.....	8
2.2 Fagositosis.....	10
2.2.1 Proses <i>Killing</i>	12
2.2.2 Sitokin.....	13
2.3 <i>Salmonella typhi</i>	17
2.3.1 Aspek Bakteriologi.....	17
2.3.2 Fase-fase Infeksi <i>Salmonella typhimurium</i> Secara Eksperimental.....	18
2.4 Respon Imun Terhadap <i>Salmonella</i>	19
2.5 Nitric Oxide (NO).....	23

2.6 <i>Aloe vera</i>	25
2.6.1 Taksonomi dan Sinonim	25
2.6.2 Habitat <i>Aloe vera</i>	26
2.6.3 Kandungan Fisik dan kimia <i>Aloe vera</i>	26
2.6.4 Komponen Kimia Aktif <i>Aloe vera</i>	28
2.6.5 Pengaruh <i>Aloe vera</i> Terhadap Respom Imun	29
2.6.6 Efek Farmakologi <i>Aloe vera</i>	31
BAB III. KERANGKA TEORI, KONSEP	
3.1 Kerangka Teori	34
3.2 Kerangka Konsep.....	37
BAB IV. HIPOTESIS	38
BAB V. METODA PENELITIAN	
5.1 Rancangan Penelitian	39
5.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	40
5.3 Populasi dan Sampel.....	40
5.4 Variabel Penelitian	42
5.5 Alat, Bahan dan Reagen Penelitian	43
5.6 Prosedur Pengumpulan Data.....	44
5.7 Alur Kerja Penelitian.....	46
5.8 Prosedur Pemeriksaan Kemampuan Fagositosis Dan Produksi No Makrofag.....	47
5.9 Definisi Operasional Variabel.....	50
6.0 Analisis Data.....	50
BAB VI. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
6.1 Hasil Penelitian	52
6.1.1 Kemampuan Fagositosis Makrofag.....	52
6.1.2 Produksi <i>Nitric oxide</i> Makrofag	55

6.2 Pembahasan.....	58
6.2.1 Kemampuan Fagositosis Makrofag.....	58
6.2.2 Produksi Nitric Oxide.....	59
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan.....	61
7.2 Saran.....	62
7.3 Rekomendasi	62
BAB VIII. RINGKASAN	63
DAFTAR KEPUSTAKAAN	66
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Analisis Indeks Fagositosis Makrofag	52
Tabel 2. Hasil Uji Bonferoni Indeks Fagositosis Makrofag	54
Tabel 3. Hasil Analisis Produksi <i>Nitric Oxide</i> (NO).....	55
Tabel 4. Hasil Uji Mann Whitney Terhadap Produksi <i>Nitric Oxide</i> (NO).....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme Fagositosis dan Penghancuran Mikroba	
Intraselluler	12
Gambar 2. Pembentukan <i>Reactive Nitrogen Intermediates</i> (ROI).....	23
Gambar 3. Pembentukan <i>Nitric Oxide</i> (NO).....	25
Gambar 4. Grafik <i>Boxplot</i> Indeks Fagositosis Makrofag	53
Gambar 5. Grafik <i>Boxplot</i> Produksi <i>Nitric Oxide</i> (NO)	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Fagositosis Makrofag.....	75
a. Kelompok Kontrol (K).....	75
b. Kelompok P1 (0,1 ml/hari)	75
c. Kelompok P1 (0,3 ml/hari)	76
d. Kelompok P1 (0,5 ml/hari)	76
Lampiran 2. Data Penelitian.....	78
1. Kemampuan Fagositosis Makrofag (Indeks Fagositosis).....	78
2. Produksi <i>Nitric Oxide</i> (NO) (μM).....	78
Lampiran 3. Hasil Analisis Statistik.....	79

**PENGARUH JUS *Aloe vera* TERHADAP KEMAMPUAN FAGOSITOSIS
MAKROFAG DAN PRODUKSI *NITRIC OXIDE* MENCIT BALB/C YANG
DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

SUHARNI

ABSTRAK

Latar belakang : *Salmonella typhimurium* merupakan mikroorganisme gram negatif yang dapat hidup bahkan berkembangbiak dalam makrofag, tahan terhadap enzim-enzim lisosom, mempunyai kemampuan untuk mencegah dan menghambat fusi phagosom-lisosom sehingga tidak terjangkau oleh antibodi dalam sirkulasi, maka salah satu cara untuk membunuh kuman ini adalah dengan memacu fungsi makrofag untuk mengeliminasi mikroba tersebut, untuk itu diperlukan suatu zat atau senyawa imunomodulator yang mampu memacu dan meningkatkan fungsi makrofag untuk mengeliminasi mikroba tersebut. *Aloe vera* berperan sebagai imunostimulator : memacu dan meningkatkan aktivitas makrofag, menstimulasi sel T, memacu aktivitas *microbicidal* makrofag, selain itu memacu makrofag untuk melepas IL-1, TNF- α , IFN- γ dan meningkatkan produksi NO oleh makrofag.

Tujuan : Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada pemberian berbagai dosis jus *Aloe vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus *Aloe vera*.

Metoda : Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik, dengan rancangan *The Post Test-Only control Group Design* menggunakan hewan coba mencit BALB/C yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi UGM, Yogyakarta, umur 8-10 minggu, sehat, berat badan 20-30 gr, jenis kelamin betina. Sebanyak 24 ekor mencit, diadaptasi selama 1 minggu dibagi secara acak menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu ; K= kontrol ; P1= diberi jus *Aloe vera* 0,1 ml/hari peroral selama 9 hari ; P2= diberi jus *Aloe vera* 0,3 ml/hari peroral selama 9 hari ; P3= diberi jus *Aloe vera* 0,5 ml/hari peroral selama 9 hari. Semuanya diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 intraperitoneal pada hari ke-6 dan dibunuh pada hari ke-10. Setelah dibunuh dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian jus *Aloe vera* dosis bervariasi (0,1 ml/hari, 0,3 ml/hari, 0,5 ml/hari) dapat meningkatkan indeks fagositosis makrofag secara bermakna ($p < 0,0001$) dimana kemampuan fagositosis tertinggi terdapat pada kelompok P3. Pemberian jus 0,1 ml, 0,3 ml meningkatkan produksi NO tetapi tidak berbeda bermakna, sedangkan pemberian 0,5 ml/hari meningkatkan produksi NO secara bermakna ($p = 0,037$).

Kesimpulan : Pemberian jus *Aloe vera* dosis bervariasi dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag mencit BALB/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dinilai dari indeks fagositosis. Sedangkan pemberian jus *Aloe vera* 0,5 ml/hari meningkatkan produksi NO makrofag. Semakin tinggi dosis jus *Aloe vera* yang diberikan maka kemampuan fagositosis makrofag juga makin meningkat (*dose-response relationship*).

Kata kunci : *Aloe vera*, Fagositosis, *Nitric oxide*, *Salmonella typhimurium*

**THE EFFECTS OF *Aloe vera* JUICE ON THE MACROPHAGES
PHAGOCYTOSIS ACTIVITY AND NITRIC OXIDE PRODUCTION
OF *Salmonella typhimurium* INFECTED BALB/C MICE**

SUHARNI

ABSTRACT

Background : *Salmonella typhimurium* is a gram-negative microorganism that can persist and multiply inside macrophages. Intrinsic resistance of the organism to lysosomal enzymes and its ability to create different type of vacuoles to prevent phagolysosome formation. Therefore to kill this bacteria require immunomodulator to enhance the activity of macrophages to eliminate the microorganism. According to previous studies *Aloe vera* has immunomodulator effect that could enhance macrophages activity, stimulation of T cell, macrophages microbicidal activity and also stimulate macrophages to secrete Interleukin-1 (IL-1), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Nitric oxide (NO).

Objective : The aims of the research is to examine effect of *Aloe vera* juice on the macrophages phagocytosis activity and nitric oxide production of *Salmonella typhimurium* infected BALB/C mice.

Method : An animal experimental study was carried out, using the post test only control group design in BALB/C mice. A total of 24 health female mice, 8-10 weeks, 20-30 g were divided randomly in to 4 groups for the examination of macrophages phagocytosis activity and NO production. 0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml of *Aloe vera* juice were given daily to the group 2,3 and 4 consecutively for 9 day. All groups were intraperitoneally injected with 10^5 *Salmonella typhimurium* at day 6th and then were killed at day 10th. The ability of macrophages phagocytosis activity were analyzed by using the One-way ANOVA and Bonferoni test. NO production was determined by using Griess method and analyzed by using Kruskal Wallis and Mann-Whitney test.

Result : The result showed that giving of *Aloe vera* juice with variation at dosage (0.1 ml/day, 0.3 ml/day, 0.5 ml/day) can increased phagocytic index of of macrophages significantly ($p < 0.0001$). The NO production at three group increased too but increased significantly at P3 ($p = 0.037$) with dosage 0.5 ml/day.

Conclusion : *Aloe vera* juice with variation dosage can increased phagocytic index of macrophages and NO production at dosage 0.5 ml/day.

Keywords : *Aloe vera*, Phagocytic index, NO, *Salmonella typhimurium*.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Demam typhoid merupakan penyakit sistemik akut yang disebabkan oleh *Salmonella typhi*. Di dunia, insidensi demam typhoid diperkirakan mencapai 16 juta kasus setiap tahunnya. Lebih dari 600.000 orang meninggal setiap tahun karena penyakit ini. Di Indonesia, demam typhoid merupakan penyakit endemik dan menjadi masalah kesehatan yang serius. Insiden rata-rata mencapai 350-810 dan 650 kasus per 100.000 penduduk di Indonesia, dengan mortalitas rata-rata bervariasi dari 3,1-10,4%.¹

Salmonella typhi merupakan mikroorganisme fakultatif intraselluler yang dapat hidup bahkan berkembangbiak dalam makrofag, tahan terhadap enzim-enzim lysosom, mempunyai kemampuan untuk mencegah dan menghambat fusi *phagosome-lysosome* sehingga sulit untuk dibunuh,^{2,3} maka salah satu cara untuk membunuh kuman ini adalah dengan memacu fungsi makrofag untuk *killing* melalui *respiratory burst*, baik dengan proses oksidatif maupun non-oksidatif, sehingga diproduksi radikal bebas dan *Nitric oxide* (NO).

NO merupakan antimikroba yang sangat penting terhadap *Salmonella*. Gugus radikal yang dibentuk oleh NADPH oksidase dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dari makrofag yang teraktifasi diduga berperan kuat sebagai efektor terhadap bakteri *salmonella*. NADPH oksidase dibutuhkan dalam *killing* beberapa jam pertama setelah fagositosis, sedangkan iNOS berperan dalam fase

awal dan berikutnya pada aktifitas antibakterial. Sedangkan IFN- γ berperan secara simultan dalam meningkatkan aktifitas bakteri dengan meningkatkan produksi NO.^{4,5} Untuk itu diperlukan suatu zat atau senyawa imunomodulator yang mampu memacu dan meningkatkan kemampuan makrofag dalam memproduksi NO untuk mengeliminasi mikroba tersebut.

NADPH oksidase dan iNOS, dapat bersinergi membentuk molekul antimikroba yang potensial. NO dan O_2^- dapat bereaksi membentuk ONOO⁻ (peroksinitrit), suatu oksidan yang dapat meningkatkan daya bunuh terhadap salmonella. NADPH oksidase mengkatalisis molekul O_2 menjadi O_2^- (superoksida) yang dapat dimetabolisir menjadi ROI seperti H_2O_2 yang sangat toksik, molekul ini berperan penting dalam *killing* oleh makrofag terhadap Salmonella karena bersifat bakterisid. Disamping itu iNOS mengkatalisis L-arginin menjadi sitrulin dan NO yang selanjutnya dapat dimetabolisir menjadi *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNI).^{4,5}

Beberapa upaya mikroorganisme intraselluler menghindari dari respon imun adalah menghindari atau mengacaukan respon imun penjamu. Beberapa konsep kunci mekanisme efektor antibakterial makrofag teraktivasi antara lain ; memproduksi NO, ROI, pembunuhan intrafagosom, asidifikasi fagosom, fusi fagosom-lisosom dan mengurangi *supply* Fe. Sedangkan upaya penghindaran mikroorganisme terhadap respon imun antara lain : *uptake* melalui reseptor komplemen, memproduksi molekul yang merusak ROI, antara lain ; superoksida dismutase, *catalase ROI scavenger* (antara lain *phenolic glycolipid sulfatides*, *lipoarabinomannan*), menghindari dari phagolisosom dengan masuk ke dalam

sitoplasma, membentuk dinding sel yang kuat, menetralkan fagosom dengan komponen basa, misal NH_4^+ , menghambat fusi fagosom dengan NH_4^+ , sulfatides, glikolipid dan menghasilkan *siderophore* (mekanisme penghindaran oleh mikroba),² disamping itu Salmonella mempunyai kemampuan mutasi dengan berbagai jalan antara lain menghambat aktifitas iNOS.⁶

Aloe Vera (AV) merupakan tanaman sekulen dan perenial yang tahan terhadap kekeringan. Menurut sejarahnya, AV telah banyak digunakan dalam berbagai pengobatan. Pada pengobatan Ayurvedic (pengobatan tradisional India), AV digunakan (pemakaian internal) sebagai *laxative*, antihelminthes, pemulihan *hemorrhoid*, dan stimulasi uterin (*menstrual regulation*). Dalam pemakaian topikal, yang dicampur dengan akar *licorice*, AV digunakan untuk pengobatan *eczema* atau *psoriasis*.⁷ Oleh bangsa Arab AV digunakan untuk mengobati sakit kepala, menurunkan panas tubuh, menyembuhkan luka, *conjunctivitis*, sebagai *laxative* dan desinfektan.⁸

Dilaporkan bahwa baru-baru ini AV memiliki berbagai efek fisiologis terhadap tubuh sebagai antioksidatif, antikarsinogenik, dermatitis, antivirus, pemulihan ulserasi, antiinflamasi, mempengaruhi fungsi hepar dan **memodulasi sistem imun.**^{9,10}

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa polisakarida yang dikandung oleh AV (β -1,3 ; β -glucan dan β -1,4 yang dikenal sebagai **acemannan**) merupakan senyawa yang bersifat **imunomodulator.**^{11,12} Efek imunostimulan yang telah dibuktikan secara *in vitro* adalah : memacu dan meningkatkan aktivitas makrofag dan monosit, menstimulasi sel T dan memacu aktivitas *candidacidal* makrofag.

^{13,14,15,16,17,18} Selain itu, AV diketahui dapat memacu makrofag untuk melepas interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor nekrosis alpha (TNF- α), dan interferon gamma (INF- γ).^{13,19} Penelitian lain juga membuktikan bahwa acemannan, selain mampu meningkatkan aktivasi makrofag, juga meningkatkan sintesis NO yang dipapar dengan *Candida*, induksi terjadi melalui *NO synthase* pada level transkripsi.¹⁸

Dengan meningkatnya aktivitas makrofag, stimulasi sel T, sitokin-sitokin yang dilepas oleh makrofag yang berkaitan dengan proses fagositosis dan *killing* oleh makrofag, maka diharapkan respon imun akan terpacu untuk mengeliminasi bakteri patogen intraseluler, terutama *Salmonella*.

Salmonella typhi sebagai penyebab demam typhoid merupakan kuman batang yang motil, gram negatif, bersifat fakultatif intraseluler.²¹ Sistem imun tubuh yang berperan untuk membunuh bakteri ini adalah sistem imun seluler. Sel-sel imun yang berperan dalam imunitas ini adalah fagosit polimorfonuklear (granulosit), sel NK, makrofag dan limfosit T. Cara membunuh bakteri ini adalah : (1). Penghancuran bakteri yang difagosit oleh makrofag yang diaktivasi oleh sitokin-sitokin yang diproduksi limfosit T. (2). Lisis terhadap sel yang terinfeksi oleh sel T CD8⁺ (CTLs) dan sel NK.^{2,3}

Pemilihan kuman *Salmonella typhimurium* disebabkan kuman ini merupakan imunogen yang bersifat fakultatif intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal makrofag. Karena hidup intraseluler maka antibodi, komplemen dan sel granulosit tidak dapat mencapai kuman tersebut. Walaupun antibodi mungkin memainkan peranan dalam pencegahan infeksi, tetapi makrofaglah yang

merupakan pertahanan utama terhadap bakteri tersebut. Mekanisme imun yang berperan dalam menghadapi infeksi *Salmonella typhimurium* adalah respon imun seluler (*Cell-mediated immunity*). Selain itu infeksi kuman ini analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* yang masih banyak menimbulkan gangguan intestinal. *Salmonella typhimurium* yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain salmonella virulen (*phage type 510*) dengan dosis LD₅₀ adalah 10⁶. Dosis yang digunakan untuk pemeriksaan imunitas ini adalah 10⁵.²²

Walaupun telah banyak dilakukan penelitian terhadap *Aloe vera*, tetapi sejauh ini belum banyak digali pengaruh pemberian *Aloe vera* terhadap kemampuan fagositosis dan produksi NO makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Dengan melihat tinjauan diatas maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada pemberian berbagai dosis jus *Aloe vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus *Aloe vera*.

Pada penelitian ini tidak digunakan *Salmonella typhi* untuk menginduksi demam typhoid pada manusia karena alasan etik. *Salmonella typhimurium* merupakan agen yang menyebabkan salmonellosis pada mencit yang analog dengan demam typhoid yang disebabkan oleh *S. typhimurium* pada manusia.²³

1.2 PERUMUSAN MASALAH

Apakah pemberian jus *Aloe vera* dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi *nitric oxide* (NO) makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus *Aloe vera* ?

1.3 TUJUAN PENELITIAN

1.3.1 TUJUAN UMUM

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada pemberian berbagai dosis jus *Aloe vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus *Aloe vera*.

1.3.2 TUJUAN KHUSUS

1. Mengetahui kemampuan fagositosis makrofag pada mencit BALB/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi berbagai dosis jus *Aloe vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut.
2. Mengetahui produksi NO makrofag pada mencit BALB/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi berbagai dosis jus *Aloe vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus tersebut.

1.4 MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi akan peranan *Aloe vera* sebagai nutrisi untuk meningkatkan imunitas selluler yang dapat digunakan sebagai terapi nutrisi pada penyakit infeksi oleh kuman *Salmonella typhimurium* dan mempercepat penyembuhan. Karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba maka hasil penelitian ini diharapkan juga dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 MAKROFAG

Sumsum tulang menghasilkan sel induk mieloid yang berkembang menjadi sel fagosit mononuklear (monosit dan makrofag serta granulosit) dan sel-sel polimorfonuklear (neutrofil, eosinofil dan basofil). Fungsi sel fagosit mononuklear yaitu : 1). sebagai fagosit profesional dengan fungsi utama menghancurkan antigen dan, 2). kedua sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC) yang berfungsi menyajikan antigen kepada limfosit. Sebagai fagosit profesional, sel ini dapat menghancurkan antigen dalam fagolisosom, dan juga melepaskan berbagai enzim dan isi granula ke luar sel, bersama-sama dengan sitokin seperti *Tumor Nekrosis Factor* (TNF) yang dapat membunuh organisme patogen.²

Makrofag merupakan fagosit profesional yang terpenting. Sel ini diproduksi di sumsum tulang dari sel induk mieloid melalui stadium promonosit. Sel yang belum berkembang sempurna ini kemudian masuk ke dalam aliran darah sebagai monosit dan apabila meninggalkan sirkulasi dan sampai di jaringan mengalami perubahan tambahan dan menjadi sel matang kemudian menetap di jaringan sebagai makrofag. Sel-sel ini antara lain terdapat di paru-paru sebagai makrofag alveolar, di hati sebagai sel *Kupffer*, melapisi sinusoid limpa dan kelenjer limfe, sebagai sel mesengial dalam glomerulus, sel mikroglia di otak dan sel osteoklast dalam tulang. Kehadirannya di sepanjang kapiler memungkinkan untuk menangkap patogen dan antigen yang masuk ke dalam tubuh dengan

mudah. Masa hidup makrofag dapat mencapai beberapa bulan bahkan tahun, jauh lebih panjang dibandingkan dengan sel-sel polimorfonuklear (PMN) yang hanya hidup selama 2-3 hari.^{2,3,24}

Makrofag memfagositosis partikel asing seperti mikroorganisme, makromolekul termasuk antigen bahkan sel atau jaringan sendiri yang mengalami kerusakan atau mati. Pengenalan makrofag terhadap substansi asing dimungkinkan oleh adanya reseptor untuk fosfolipid sedangkan fungsi sebagai sel efektor yaitu menghancurkan mikroorganisme serta sel-sel ganas dan benda-benda asing dimungkinkan karena sel ini antara lain mempunyai sejumlah lisosom di dalam sitoplasma yang mengandung hidrolase maupun peroksidase yang merupakan enzim perusak yang dibutuhkan untuk pembunuhan intraseluler. Selain itu makrofag mempunyai reseptor terhadap fragmen Fc IgG1 dan IgG3 serta IgE dan reseptor terhadap komponen seperti C3b pada permukaan sel, yang meningkatkan kemampuan fagositosis sel terhadap antigen yang dilapisi oleh antibodi atau komplemen. Dengan demikian, makrofag merupakan *scavenger cell* utama dalam tubuh. Makrofag juga mengekspresikan MHC Kelas II pada permukaannya, dan ekspresi MHC Kelas II ini meningkat bila makrofag diaktivasi. Hal ini penting karena sebagai sel efektor, makrofag juga berfungsi menyajikan antigen kepada sel T yang dilakukannya bersama molekul MHC Kelas II. Monosit dan makrofag juga mempunyai reseptor untuk berbagai jenis limfokin misalnya reseptor untuk *migration inhibition factor* (MIF) dan IFN- γ , juga memproduksi sejumlah sitokin untuk merekrut sel-sel inflamasi, khususnya neutrofil. Selanjutnya monosit dan makrofag dapat diaktifkan oleh *macrophage*

activating factor (MAF) yang dilepas oleh sel T tersentisasi.^{2,25,26} Makrofag teraktivasi merupakan sel-sel efektor penting dalam proses inflamasi dan pertahanan host terhadap mikroorganisme, dengan cara memfagositosis dan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS).²⁷

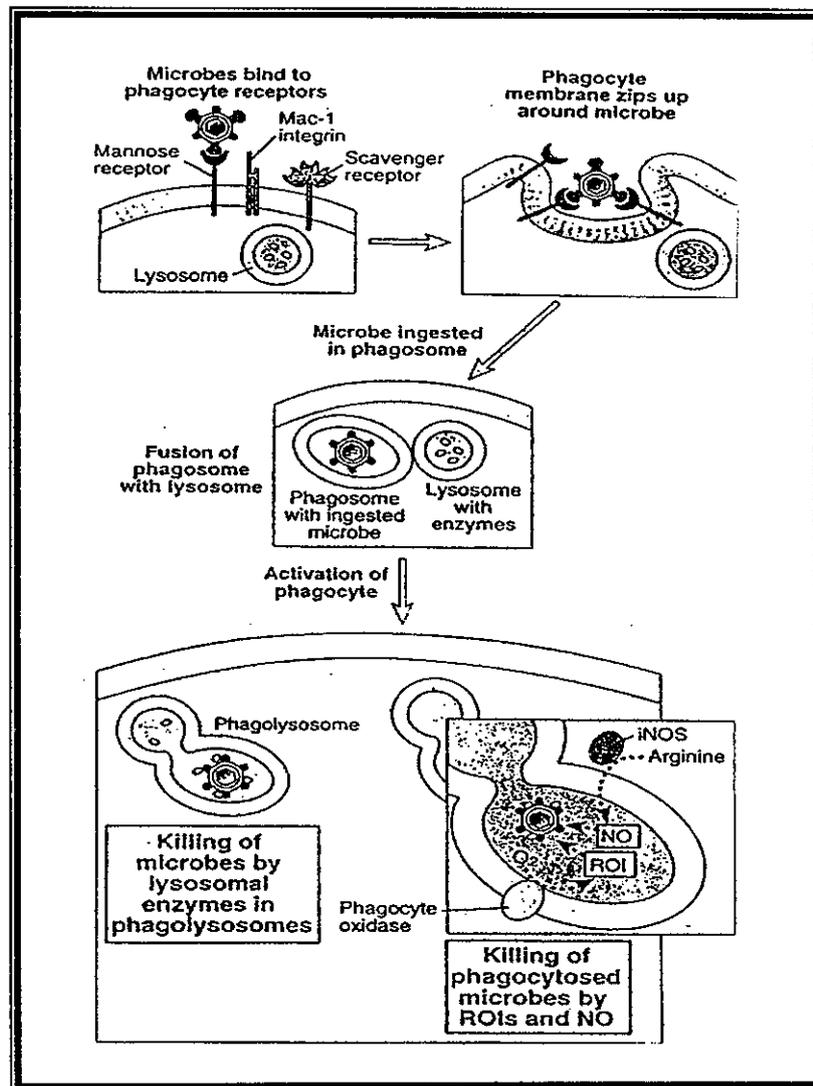
2.2 FAGOSITOSIS

Fagositosis adalah proses penelanan antigen termasuk dari seluruh mikroorganisme patogenik (Gambar 1). Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan dapat mencegah timbulnya penyakit. Dalam kerjanya, sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik.

Makrofag mampu menelan antigen yang berbentuk partikel maupun yang larut, kemudian memprosesnya dengan cara degradasi, denaturasi atau modifikasi dan selanjutnya menyajikan fragmen-fragmen antigen tersebut ke sel T. Proses fagositosis berlangsung dalam beberapa tahap berurutan yaitu :

1. Kemotaksis, adalah gerakan fagosit ke tempat infeksi sebagai respon terhadap berbagai faktor seperti produk bakteri dan faktor biokimiawi yang lepas pada aktivasi komplemen.
2. Adhesi, merupakan proses perlekatan membran plasma fagosit dengan permukaan mikroorganisme atau benda asing lainnya. Makrofag bisa dengan mudah memfagosit bakteri jika mereka dilapisi terlebih dahulu dengan protein plasma tertentu yang mendukung adhesi. Proses pelapisan ini disebut "opsonisasi" dan proteinnya disebut "opsonin" yang berupa beberapa komponen sistem komplemen dan molekul antibodi.

3. Penelanan (*ingesti*). Proses penelanan bakteri terjadi karena fagosit membentuk tonjolan pseudopodi pada membran plasmanya, kemudian membentuk kantung yang mengelilingi bakteri pada saat mereka dicaplok. Bakteri kemudian akan terkurung dalam kantung yang disebut fagosom (vakuola fagositik). Dinding fagosom dengan demikian terdiri dari dinding bagian luar fagosit.
4. Pencernaan. Pada saat fagosom masuk ke sitoplasma, dia akan berhubungan dengan lisosom yang berupa granula intraselluler yang berisi berbagai jenis enzim termasuk enzim digesti, protein dan substansi bakterisidal lainnya. Pada saat kontak, fagosom dan lisosom bergabung membentuk fagolisosom. Beberapa enzim lisosom seperti lipase, protease, ribonuklease, dan deoksiribonuklease. Dalam beberapa detik setelah terjadinya fusi akan berlangsung degranulasi dan pembunuhan (*killing*) lewat *respiratory burst*. Enzim dan protein yang terdapat dalam granula mampu membunuh kuman, baik dengan proses oksidatif maupun non-oksidatif.^{2,3}



Gambar 1. Fagositosis dan Penghancuran mikroba intraselluler. (Diambil dari Abbas AK, Litchman AH. *Cellular and Molecular Immunology*, Fourth Edition. Philadelphia; WB Saunders CO. 2000.

2.2.1 Proses Killing

Enzim dan protein yang terdapat dalam granula mampu membunuh kuman baik dengan proses oksidatif maupun non-oksidatif. Pada proses oksidatif yang berlangsung dengan mieloperoksidase reaksi didasarkan atas pengikatan H_2O_2 .

dengan Fe yang terdapat pada mieloperoksidase, membentuk kompleks enzim-substrat dengan daya oksidatif yang tinggi. Proses oksidatif menghasilkan berbagai zat toksik, misalnya asam hipoklorat, merupakan oksidan yang paling kuat membunuh bakteri. Pada proses oksidatif yang berlangsung tanpa mieloperoksidase, oksidasi masih dapat berlangsung karena adanya H_2O_2 , superoksida, dan radikal hidroksil.

Proses non-oksidatif berlangsung dengan bantuan berbagai protein sitolitik misalnya flavoprotein, sitokrom b, laktoferin, lisozim, katepsin G, difensin dan lain-lain. Pada proses pembunuhan mikroorganisme, pH dalam fagosom dapat meningkat menjadi alkalis dan kemudian menurun lagi menjadi asam. Mekanisme pembunuhan non-oksidatif dapat terjadi karena protein bermuatan positif yang ada dalam PMN dan makrofag dalam suasana pH alkalis bersifat toksik yang dapat merusak lapisan dinding kuman gram negatif.^{2,3}

2.2.2 Sitokin

Beberapa sitokin yang berperan dalam fungsi efektor pada *innate immunity*, antara lain adalah :

a. *Tumor Necrosis Factor* (TNF)

Merupakan mediator utama pada respon terhadap bakteri gram negatif dan berbagai mikroorganisme penyebab infeksi. TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel seperti makrofag, sel T, B, NK, astrosit dan *Kupffer*. Pembentukan terjadi sebagai respon terhadap rangsangan bakteri, virus, sitokin (GM-CSF, IL-1, IL-2, IFN- γ) komponen komplemen C5a dan *Reactive Oxygen*

Intermediate (ROI). Berfungsi meningkatkan ekspresi molekul adhesi yang memudahkan leukosit melekat pada permukaan endotel, juga merangsang sel fagosit mononuklear mensekresi *chemokine*, serta mengaktivasi leukosit.

b. *Interferon gamma* (IFN- γ)

IFN- γ diproduksi oleh sel CD4⁺, CD8⁺ dan sel NK teraktivasi. Transkripsi IFN- γ terjadi karena stimulasi antigen dan ditingkatkan oleh IL-2 dan IL-12. IL-12 meningkatkan ekspresi IL-18 pada sel yang memproduksi IFN- γ . Fungsi utama IFN- γ dalam respon imunitas seluler terhadap mikroba intraseluler adalah : 1). Sebagai aktifator poten untuk fagosit mononuklear. IFN- γ memacu fungsi *microbicidal* makrofag dengan menstimulasi sintesis ROI dan NO, disamping itu mengaktifkan transkripsi gen yang mengkode enzim-enzim yang dibutuhkan untuk membentuk ROI dan RNI. Enzim tersebut adalah *phagocyte oxidase* dan iNOS. Sehingga mikroba dapat dihancurkan dalam fagolisosom, IFN- γ juga meningkatkan reseptor untuk IgG (Fc γ RI) pada permukaan makrofag. 2) meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan II pada berbagai jenis sel, penting pada fase pengenalan respon imun. 3). merangsang sel T untuk berdiferensiasi dan merangsang sel B untuk meningkatkan *class switching* untuk menghasilkan IgG2a dan IgG3, 4). Mengaktivasi neutrofil dan meningkatkan *respiratory burst*, 5). Merangsang aktivitas sitolitik sel NK, 6) merupakan aktivator sel endotel, meningkatkan sel T CD4⁺ dan perubahan morfologis yang memudahkan ekstrasvasi limfosit. Reseptor IFN- γ dibangun dari 2 struktur polipeptida homolog yang mempunyai 11 tipe reseptor family. Reseptor tersebut antara lain : *binding*

receptor dengan sitokin dan satunya lagi berperan dalam *signaling*. *Binding* dari sitokin mengaktifkan STAT1, yang menstimulasi transkripsi *IFN- γ -responsive genes* (yang mengkode molekul MHC dan *B7 costimulators*), menstimulasi enzim yang mensintesis substansi *microbicidal* seperti NO, menstimulasi subunit p40 IL-12. Sedangkan *IFN- γ -responsive genes* sendiri diaktivasi oleh STAT1 atau STAT1 dengan berbagai faktor transkripsi, antara lain *IFN response factor-1* dan *trans-activator class II*. STAT1 merupakan *knock-out* terhadap *IFN- γ* .

c. *Interleukin-1 (IL-1)*

Diproduksi oleh fagosit mononuklear yang diinduksi oleh produk bakterial seperti LPS dan berbagai sitokin seperti TNF, selain itu juga diproduksi oleh neutrofil, sel epitel (a.l keratinosit) dan sel endothelial. Fungsi utama IL-1 adalah sebagai mediator respon inflamasi pejamu terhadap infeksi dan berbagai stimulasi inflamasi. Berbagai substansi dapat merangsang makrofag atau APC lain untuk membentuk IL-1, baik merangsang makrofag sendiri maupun merangsang limfosit T yang secara tidak langsung memacu pembentukan IL-1 oleh makrofag.

d. *Interleukin-6 (IL-6)*

Merupakan sitokin pleiotropik, meliputi regulasi respon imun, respon fase akut dan hematopoeisis. Sumber utama IL-6 adalah fagosit mononuklear, sel endothelial vascular, fibroblast, respon sel terhadap mikroba dan beberapa sitokin lainnya, khususnya IL-1 dan TNF, dihasilkan juga oleh sel T teraktivasi. Dalam kaitannya dengan sel T, IL-6 memegang peran penting

pada respon sel T terhadap alloantigen dan pembentukan sel T-sitotoksik, juga berperan dalam meningkatkan respon thymocyte terhadap rangsangan IL-1 dan IL-4.

e. *Interleukin-10 (IL-10)*

Sumber utama IL-10 adalah makrofag teraktifasi. Fungsi utama IL-10 adalah menghambat produksi beberapa sitokin (TNF, IL-1, *chemokine*, dan IL-12), dan menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul MHC kelas II pada makrofag, dan mengurangi ekspresi ko-stimulator (a.l B.7-1 dan B7-2). Dampak akhir dari aktivitas IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi non-spesifik maupun spesifik yang diperantarai sel T.

f. *Interleukin-12 (IL-12)*

Merupakan suatu mediator penting dari respon *innate immunity* terhadap mikroba intraselluler dan merupakan *key inducer* dari *cell-mediated immunity*, respon imun adaptif terhadap berbagai mikroba. IL-12 semula dikenal sebagai aktifator fungsi sitolitik sel NK, tetapi sangat berperan penting menstimulasi produksi IFN- γ oleh sel NK. Sumber utama dari IL-12 adalah fagosit mononuklear teraktifasi dan sel dendritik. Pada respon *innate immunity* terhadap mikroba, IL-12 diproduksi akibat rangsangan mikroba (LPS), infeksi bakteri intraselluler dan infeksi virus. Beberapa aktivitas biologik IL-12 pada populasi sel T maupun sel NK, yaitu : 1) IL-12 menyebabkan sel NK dan sel T mensekresikan IFN- γ . 2) IL-12 bertindak sebagai faktor diferensiasi sel T, meningkatkan spesialisasi sel T sebagai sel yang memproduksi IFN- γ ,

menghasilkan sel seperti sel T yang membantu respon imun sel fagosit; 3) Meningkatkan fungsi sitolitik sel NK dan sel T CD8⁺ teraktivasi.^{1,2,3}

2.3 *Salmonella typhi*

2.3.1 Aspek Bakteriologi

Salmonella typhi adalah kuman berbentuk batang, gram negatif, fakultatif anaerob serta fakultatif intraselluler yang secara khas meragikan glukosa dan manosa, tidak meragikan laktosa dan sukrosa. Kuman ini sering bersifat patogen pada manusia dan binatang bila masuk melalui mulut. Termasuk ke dalam kelompok Enterobacteriaceae dan secara signifikan menyebabkan penyakit enterik.^{21,28}

Infeksi *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) menimbulkan beberapa penyakit, antara lain ; *acute intestinal inflammation*, dengan manifestasi klinik diare dan *vomiting*, selain itu memicu diseminasi mikroba dan infeksi serius. Salah satu karakter virulensi *Salmonella* adalah mampu menginvasi sel mamalia. Setelah mengkontaminasi makanan, selanjutnya menginvasi sel-sel epitel intestinal, kemudian menembus *barrier* epitel, makrofag lamina propria dan Peyer's patches.²⁹

Struktur penting yang dibutuhkan bakteri untuk proses invasi tersebut adalah suatu sistem sekresi aparatus tipe III, yang mengkode suatu lokus, dikenal sebagai *Salmonella Pathogenicity Island 1* (SPI1). Sistem sekresi SPII adalah suatu protein *signal-peptide independent* (protein efektor, antara lain SipB, SipC, dan SipD) berperan penting pada proses invasi, yang dikirim ke sitosol sel

host. Protein efektor lainnya adalah SopB, SopE, SptP dan AvrA. Interaksi antara efektor dengan protein seluler akan meningkatkan aktifitas bakteri pada sel host. Akibat interaksi ini menyebabkan terbukanya channel ion klorida, aktivasi *signal-signal* transduksi, yang akan mengaktifasi ekspresi sitokin-sitokin proinflamasi dan menginduksi apoptosis. Selama invasi, bakteri lipopolisakarida (LPS) dan beberapa efektor *Salmonella*, mengaktifkan *cellular signaling pathways*, untuk mengaktifkan berbagai ekspresi gen yang memproduksi berbagai mediator inflamasi.^{29,30,31}

2.3.2 Fase-fase Infeksi *Salmonella typhimurium* Secara Eksperimental

Infeksi *Salmonella typhimurium* secara sistemik pada tikus diperkirakan melalui fase-fase berikut:

1. Fase pertama infeksi intravena atau intraperitoneal hanya memerlukan waktu beberapa jam, dimana terjadi distribusi mikroorganisme ke berbagai tempat. Mikroorganisme akan ditemukan di hati dan limpa 3-8 jam setelah infeksi.
2. Fase kedua. Pada fase ini selama hari pertama infeksi disebut sebagai tahap pertumbuhan eksponensial dan terjadi sebelum respon imun natural. Pada fase ini faktor genetik host memegang peran. Neutrofil sangat penting pada tahap ini. Neutrofil sebagai pertahanan yang efektif melawan infeksi *Salmonella*.
3. Fase ketiga. Setelah 3-7 hari terjadi pertumbuhan pesat mikroorganisme di hati dan limpa kemudian pertumbuhannya menetap (*latent*) di bawah pengaruh makrofag teraktifasi yang memproduksi sitokin-sitokin proinflamasi. Pada fase ini limfosit tidak begitu berperan penting. Disini makrofag lebih berperan

dalam meningkatkan daya bunuh bakteri intrasel oleh sel (sel NK atau granulosit) dengan cara memproduksi sitokin-sitokin. Fase ini disebut juga sebagai “*plateu phase*”.

4. Fase pembersihan. Fase ini terjadi selama seminggu ketiga infeksi yang melibatkan aktifitas limfosit. Pada fase ini sel T CD4⁺ memperantarai terjadinya pembersihan *Salmonella* di hati dan limpa. Sitokin yang terlibat adalah IFN γ , yang diekspresikan oleh sel T CD4⁺ dan sel NK.³²

2.4 Respon Imun Terhadap *Salmonella*

Salmonella typhi mempunyai beberapa antigen yaitu antigen O (komponen dinding sel/LPS) dan antigen H yang berasal dari protein flagel. Beberapa salmonella sp mempunyai antigen simpai (kapsul) Vi, yang dapat mengganggu aglutinasi oleh antiserum O yang berhubungan dengan virulensi. Kapsul yang dimiliki oleh *Salmonella* ini tidak dapat dihancurkan oleh antibodi. Tetapi salmonella yang diopsonisasi akan dihancurkan oleh netrofil. Fagositosis dengan opsonisasi ini dibatasi oleh polisakarida kapsul Vi pada *Salmonella typhimurium*, yang akan meningkatkan resistensi terhadap aktivasi komplemen dan lisis bakteri oleh jalur alternatif sebagaimana *killing* oleh peroksida. Antigen H juga menentukan interaksi antara *host* dan mikroba. Antigen flagel tipe H1-j yang hanya dijumpai pada infeksi di indonesia hanya mempengaruhi individu dewasa dan menunjukkan gejala penyakit yang lebih ringan dibandingkan tipe H1-d.^{33,34,35}

Salah satu ciri bakteri intraseluler fakultatif adalah dapat hidup bahkan berkembangbiak dalam fagosit. Karena mikroba ini menemukan tempat untuk bersembunyi sehingga tidak terjangkau oleh antibodi dalam sirkulasi, maka untuk

menyinkirkannya diperlukan mekanisme respon imun yang berbeda dengan respon imun terhadap mikroba ekstraseluler. Bakteri berupaya mencegah proses pembunuhan intraseluler dengan menghambat penggabungan (fusi) lisosom dengan vakuola yang berisi mikroba, menghambat fagositosis dan pembentukan ROI atau menghambat terjadinya *respiratory (oxidative) burst*. Atau mengelak dari perangkap fagosom sehingga tetap bebas dalam sitoplasma dan terhindar dari proses pembunuhan.^{2,3}

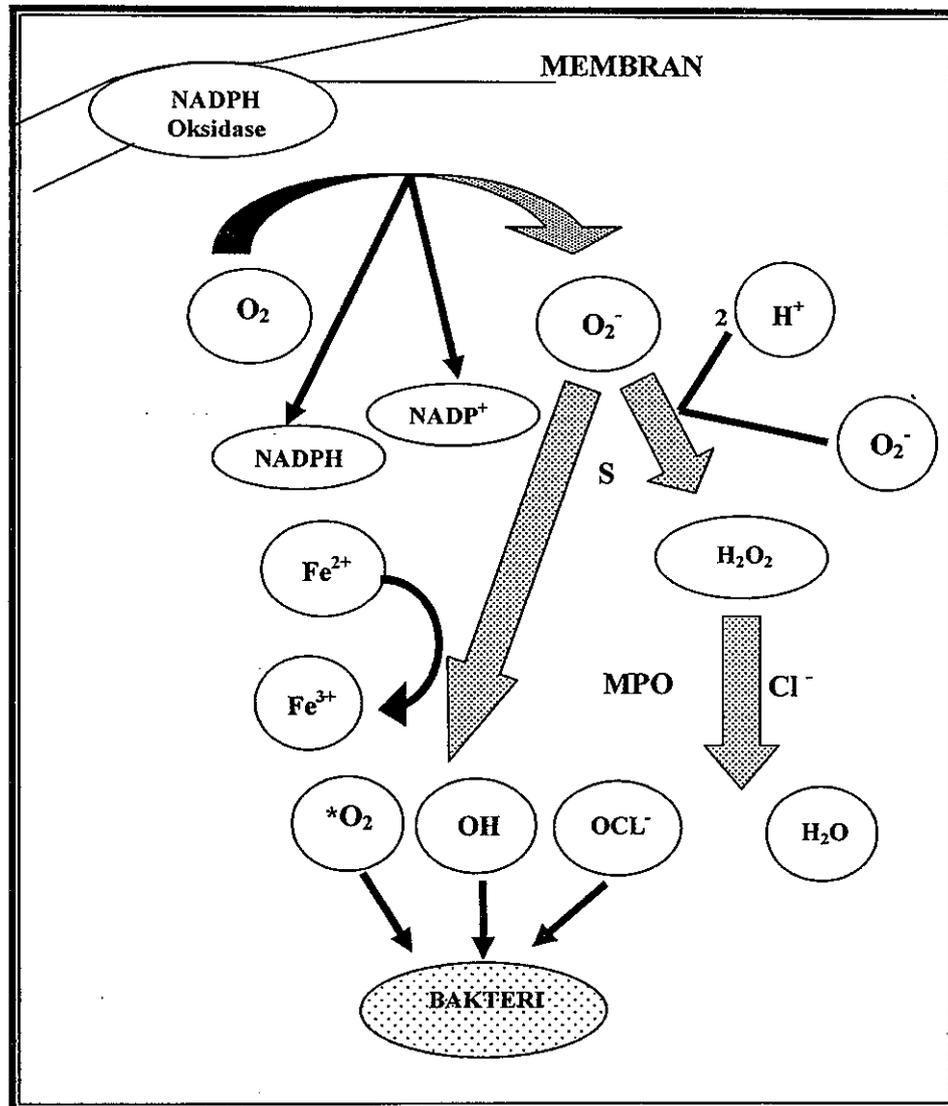
Apabila *Salmonella* masuk ke tubuh *host* maka respon imun yang pertama kali bekerja adalah respon imun alami (*innate immunity*), dimana yang berperan dalam fase ini adalah sel-sel fagosit dan sel *Natural Killer* (NK). Fagosit diawali oleh neutrofil dan makrofag yang menyerang dan menghancurkan mikroba tersebut. Tetapi peran fagosit dalam respon imun alami terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom fagosit. Selanjutnya respon imun spesifik akan teraktivasi oleh antigen *Salmonella*. Pada fase ini limfosit T akan mengaktivasi makrofag, sel NK dan sel sitolitik untuk menghancurkan bakteri. Antigen bakteri ini mengaktifasi sel NK secara langsung atau melalui stimulasi oleh IL-12 yang diproduksi makrofag. Sel NK juga akan memproduksi IFN- γ yang akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan degradasi bakteri yang difagosit.^{3,36}

Respon imun protektif terhadap bakteri intraseluler adalah imunitas seluler (*cell-mediated immunity*). Reaksi yang terjadi dalam respon imun tersebut adalah : (1). Penghancuran bakteri yang difagosit oleh makrofag yang diaktifasi oleh sitokin-sitokin yang diproduksi limfosit T dan (2). Lisis terhadap sel yang

terinfeksi oleh sel T CD8⁺ (CTLs) dan sel NK. Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ merespon antigen dari mikroba yang difagosit yang berikatan dengan molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II ke permukaan sel yang akan dikenali oleh limfosit T. Interaksi ini menyebabkan limfosit mensekresi IL-12 yang akan memacu proliferasi dan diferensiasi limfosit menjadi sel T CD4⁺. Sel T CD4⁺ ini akan mensekresi IL-2 yang akan membantu proliferasi dan diferensiasi sel T menjadi sel T CD8⁺ dan mensekresi IFN- γ yang memacu aktivasi makrofag dalam mengeliminir bakteri. Bakteri intraselluler juga akan menstimulasi makrofag untuk memproduksi IL-12 yang akan mengaktifkan sel NK, menstimulasi perkembangan sel Th1 dan mengaktifkan sel T CD 8⁺. Ketiga sel yang teraktifkan ini akan mensekresi IFN- γ yang akan mengaktifkan makrofag. IFN- γ juga yang mengaktifasi makrofag untuk memproduksi beberapa substansi *microbicidal*, terdiri dari *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI), *Nitric Oxide* (NO), dan enzim lisosom. IFN- γ juga menstimulasi produksi dari antibodi (misalnya IgG2a pada tikus), yang mengaktifkan komplement dan opsonin bakteri untuk difagositosis, yang membantu fungsi efektor makrofag.^{2,3,24}

Kemampuan makrofag membunuh bakteri tergantung pada senyawa *oxygen dependent* (*hydrogen peroxide, singlet oxygen, hydroxyl radicals*) dan senyawa *oxygen independent* (*lisosome, lactoferin, cationic protein*). Makrofag yang teraktivasi akan memproduksi *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) dan *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNI) dan enzim-enzim yang akan membunuh bakteri yang difagosit sebagai sel efektor.^{3,37}

Yang termasuk kelompok ROI adalah radikal superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan *singlet* oksigen. ROI sangat reaktif sehingga dapat membunuh dan menghancurkan sel-sel bakteri. Dalam proses ini kebutuhan oksigen meningkat sampai 100 kali, sehingga proses ini disebut *respiratory burst* (letupan respirasi). Bakteri masuk ke dalam fagosom, menyatu dengan lisosom membentuk fagolisosom. Disini terjadi 2 proses yaitu : *respiratory burst* dan digesti oleh enzim lisosom. *Respiratory burst* dimulai dari perubahan O_2 menjadi O_2^- oleh NADPH oksidase. Dalam reaksi yang dikatalisis oleh Superoksida Dismutase (SOD), dua molekul H^+ dan O_2^- akan membentuk H_2O_2 . Sedangkan di neutrofil H_2O_2 tersebut akan dikonversi membentuk molekul-molekul bakterisidal oleh enzim Mieloperoksidase (MPO). MPO sendiri akan mengkatalisis oksigenasi dari ion halide (misalnya : Cl^-) untuk membentuk hipoklorida yang bersifat bakterisidal kuat. Dengan adanya Fe^{+2} maka O_2^- dan H_2O_2 bereaksi membentuk OH dan $*O_2$ (*singlet* oksigen) yang sangat reaktif sebagai bakterisid. Enzim lisosom bertugas mencerna fragmen-fragmennya, setelah sel bakteri mengalami disintegrasi. Daya bunuh makrofag dengan ROI merupakan aktifitas antimikroba yang dilakukan beberapa jam sesudah fagositosis. *Respiratory burst* mempunyai peran yang sangat esensial dalam membunuh *Salmonella* yang virulen.^{37,38}



Gambar 2. Pembentukan ROI
(Diambil dari Mc. Kee T, Mc. Kee JR. Biochemistry, USA : Wim. C. Brown Publisher, 1996).

2.5 Nitric Oxide (NO)

RNI akan berperan pada fase awal dan berikutnya pada aktifitas antibakteri makrofag. Yang termasuk dalam kelompok RNI adalah NO, nitrit dan nitrat.³⁹ Makrofag menciit yang teraktifasi oleh sitokin $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, $IL-1$, $IL-2$

dan lipid A dari lipopolisakarida (LPS) bakteri dengan bantuan *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) akan terinduksi untuk membentuk NO dari prekursor L-arginin.^{40,41}

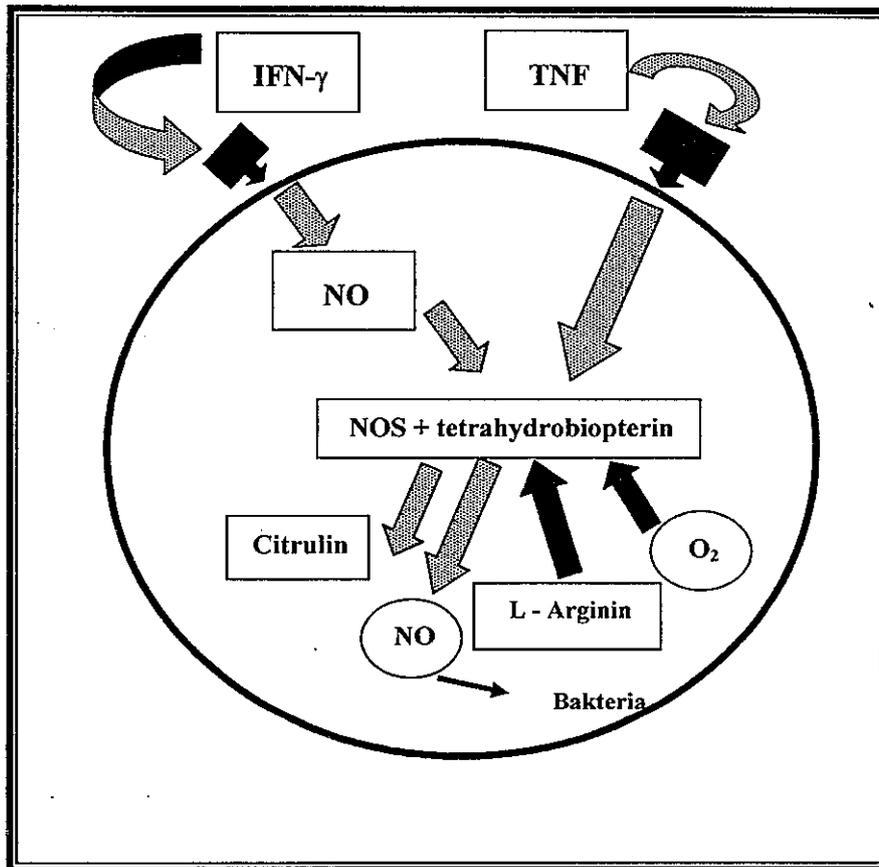
NOS terdiri dari 3 bentuk *isoform* yang dibedakan atas pola ekspresi dan kebutuhan kalsium yaitu : *neural Nitric Oxide Synthase* (nNOS), *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) dan *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS). nNOS dan eNOS diatur oleh suatu kompleks kalsium/calmodulin, sedangkan iNOS merupakan suatu enzim Ca^{+2} *independent*. Bentuk *isoform* utama yang diekspresikan dalam makrofag adalah : NOS2, dikenal sebagai iNOS yang menginduksi ekspresi NO, *isoform* tersebut mengaktifkan kalsium pada *resting cell* dan mengontrol produksi NO, sedangkan ekspresi iNOS diatur oleh kalium dan sintesis NO dalam makrofag.²⁷

NOS akan berikatan dengan molekul kofaktor tetrahidrobiopterin. Dengan bantuan O_2 , ikatan NOS dan kofaktor ini akan mengubah L-arginin menjadi sitrulin dan NO (Gambar 3).³⁷ NO inilah yang bersifat toksik pada bakteri dan sel-sel tumor, menghambat replikasi virus serta jamur, protozoa dan helminthes.²⁷

NO mempunyai aktifitas antimikroba yang penting terhadap *Salmonella*. Respon imun Th_1 yang didominasi oleh $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, dan IL-12 bersama NO merupakan efektor terhadap *S. typhimurium*. Hasil autooksidasi NO seperti NO_2 , N_2O_3 dan S-nitrosotiol juga akan meningkatkan potensi sitotoksitas.^{5,41,42}

Selain reaksi tersebut diatas, sinergi ROI dengan RNI dapat membentuk spesies antimikroba yang lebih toksik, misalnya NO bereaksi dengan *singlet* oksigen O_2 membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$) suatu oksidan yang dapat merusak

lipid, protein dan DNA bakteri. Peroksinitrit ini dapat meningkatkan daya bunuh makrofag terhadap *Salmonella*.⁴⁰



Gambar 3. Pembentukan NO Dalam Pembunuhan Bakteri (Diambil dari Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Barcelona. Spain : Mosby, 1998 :17.6)

2.6 *Aloe vera*

2.6.1 Taksonomi dan Sinonim

Nama *Aloe vera* berasal dari bahasa Arab yaitu *Alloeh* yang berarti *a shining bitter substances*. Dalam bidang medis Aloe dikenal juga dengan nama : *Aloe vera*, (Curacao atau Barbados aloe), *A. vulgaris*, *A. arborescens*, *A. ferox*

(Cape aloe), *A. perryi* (Socotrine atau Zanzibar aloe). Perbedaan dari masing-masing spesies mempunyai komponen atau senyawa aktif yang berbeda-beda. Nama umum yaitu : Aloe, *Aloe capensis*, *Aloe spicata*, *Aloe vera*, *Barbados aloe*, Kumari (Sanskrit), Laloi (Haiti), Lohoi (Vietnam), Luhui (Chinese), Nohwa (Korea), Rokai (Japanese), Sabilla (Cuba), Socotrine aloe, Subr (Arabic), Zanzibar aloe.^{8,43,44}

Dalam Ilmu Botani *Aloe vera* dikelompokkan ke dalam famili Liliaceae. Deskripsi tanaman tersebut adalah : panjang mencapai 20 inch, lebar mencapai 5 inch, triangularis, daging daun mempunyai duri disepanjang tepinya. Parenkim yang segar (*gel*) berasal dari bagian tengah daun yang bening. Cairan getah (*latex*) bersifat lengket, hijau kekuningan berasal dari pembuluh *pericyclic* lapisan daun (kulit) yaitu bagian yang menghasilkan *anthraquinones*.^{7,45}

2.6.2 Habitat Aloe vera

Aloe merupakan tanaman asli Africa Selatan dan America Selatan, menyebar luas di seluruh dunia kecuali di daerah tundra, gurun pasir dan daerah *rain forest*. Rentang hidup lebih dari 4 tahun sampai mencapai 12 tahun.⁷

2.6.3 Kandungan Fisik Dan Kimia Aloe vera^{46,47,48}

Tanaman *Aloe vera*, merupakan tanaman kaktus, mengandung 99- 99,5 % air, dengan pH rata-rata 4,5. Mengandung lebih dari 75 komponen yang berbeda termasuk vitamin, mineral, enzim, gula, senyawa *anthraquinones* atau *phenolic*,

lignin, saponin, sterol, asam amino dan asam salisilat. Masing-masing dijelaskan lebih rinci pada uraian berikut :

A. Vitamin dan Mineral

Mengandung vitamin yaitu : C, A, E, B-1,2,6,12 (satu-satunya tanaman yang diketahui sebagai sumber vitamin 12).

B. Enzim

Mengandung enzim-enzim pencernaan antara lain : amilase, lipase, laktase dan enzim lainnya, yang mudah rusak oleh panas.

C. Mineral

Mengandung Sodium, Potasium, Kalsium, Magnesium, Mangan, *Coper*, Seng, Cromium, Selenium dan Besi.

D. Karbohidrat dan lignin

Karbohidrat berasal dari lapisan *mucilage* dibawah epidermis dari tanaman berupa 25% pecahan (*fraction*) padat, yang terdiri dari monosakarida. Rantai panjang polisakarida, terdiri dari glukosa dan manosa yang dikenal sebagai glukomannan (Beta-(1,4)-berikatan dengan *acetylated mannan*). Disini senyawa tersebut bertindak sebagai **imunomodulator**.

E. Anthraquinones

Mengandung 12 senyawa *phenolic* yang ditemukan dalam getah tanaman AV, berasa pahit terdiri dari *free anthraquinones* dan *derivatnya* yaitu : barbaloin-IO-(1141-anhydroglucosyl)-aloe-emodin-9-anthrone), isobarbaloin, anthrone-C-glycosides dan *chromones*. Dalam jumlah besar mempunyai efek *purgative* sedangkan pada konsentrasi yang lebih rendah, berpotensi sebagai

antimikrobia dan efek analgesik. Senyawa ini dapat menyerap sinar UV, menghambat aktivitas tyronase, reduksi struktur melanin dan hiperpigmentasi.

F. Saponin

Tiga persen dari gel merupakan saponin, berfungsi sebagai *cleansing*, *antiseptic*, *antimicrobial* terhadap virus, bakteri, fungi dan *yeast*.

G. Lemak

Terdiri dari kolesterol, campesterol, sitosterol, dan lupeol.

H. Asam Salisilat

Berperan sebagai antiinflamasi dan antibakterial, mempunyai efek *kerolytic* yang membantu penyembuhan terhadap debris jaringan yang mengalami nekrosis.

I. Asam Amino

Mengandung 20 asam amino esensial yang dibutuhkan oleh tubuh, 7 dari asam amino tersebut tidak dapat disintesis oleh tubuh.

J. Sterol

Mengandung sterol yang terdiri dari : compesterol, F3 sitosterol, dan lupeol.

2.6.4 Komponen Kimia Aktif *Aloe vera*

Komponen kimia aktif AV berasal dari gel dan lapisan getah daun, untuk lebih jelasnya diterangkan di bawah ini :

- a. Yang berasal dari gel yaitu polisakarida berupa acemannan dan glucomannan , selain itu juga mengandung : carboxypeptidase, magnesium, zinc, calcium,

glukosa, kolesterol, salicylic acid, prostaglandin precursors (gamma-linolenic acid [GLA]), vitamin A, C, E, lignins, saponins, plant sterol dan amino acid.⁴⁹

- b. Berasal dari lapisan getah daun (*latex leaf lining*) yaitu *anthraquinone glycosida* terdiri dari : aloin, aloe-emodin, barbaloin (15%-30%).

Gel atau *mucilage* diperoleh dari daging daun, sedangkan *latex* (pahit) diekstrak dari lapisan luar daun. Gel Aloe terdiri dari 90% air dengan pH 4.5. Gel terdiri dari emollient polysakarida, *glucomannan*, yang banyak digunakan sebagai *moisturizer* dalam kosmetik. *Acemannan*, adalah fraksi karbohidrat terbanyak di dalam gel, merupakan polymer mannosida rantai panjang yang larut dalam air, berguna untuk mempercepat penyembuhan, memodulasi fungsi imun (mengaktivasi makrofag dan produksi sitokin), antineoplastik dan anti virus.^{13,50,51} Gel juga mengandung *bradykininase*, sebagai anti-inflamasi,⁵² *magnesium laktat* membantu mencegah rasa gatal, asam salisilat dan beberapa senyawa *antiprostaglandin* yang mengurangi inflamasi. Lapisan daun (*latex*, resin atau *sap*) mengandung *anthraquinone glycoside* (aloin, aloe-emodin dan barbaloin) berperan menstimulasi laksatif. *Glycoside* ini larut dalam air, mempunyai efek laksatif lebih kuat dibandingkan dengan tanaman herba lainnya seperti ; senna, cascara, dan akar rhubarb, tapi juga mempunyai efek samping antara lain : kejang-kejang, diare, dan mual.⁵³

2.6.5 Pengaruh *Aloe vera* Terhadap Respon Imunitas

Data *invitro* menunjukkan bahwa AV yang mengandung acemannan mampu meningkatkan fungsi monosit, aktivitas makrofag, sitotoksitas,

menstimulasi sel T, memacu/meningkatkan aktivitas *candidacidal* makrofag (*in vitro*).^{13,14,15,16,17,18} Selain itu acemannan meningkatkan dan memacu makrofag melepas interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis faktor alpha (TNF-a) dan interferon gamma (IFN-g), tergantung pada dosis pemakaian.^{13,19}

Disamping itu, ekstrak aloe menghambat produksi prostaglandin dari asam arachidonat dan mereduksi inflamasi.⁷ Acetyl mannans yang diinjeksikan secara subkutan ke dalam *myelosupressed* tikus, menstimulasi peningkatan jumlah leukosit, sel-sel spleen, jumlah neutrophil, limfosit dan monosit,^{54,55,56,57,58,59} selain itu ekstrak aloe mampu mereduksi supresi hipersensitivitas tipe lambat (*delayed type hypersensitivity*).⁷ Selain itu AV mempunyai efek anti-inflamasi yang setara dengan hydrocortisone pada tikus percobaan,⁶⁰ dan memblok respon inflamasi sel mast terhadap kompleks antigen-antibodi.^{61,62}

Penelitian pada manusia menunjukkan bahwa pasien yang terinfeksi HIV-1 yang mengkonsumsi 800mg/hari acemannan, secara signifikan meningkatkan sirkulasi monosit dan makrofag serta mengalami perbaikan secara klinis. Penelitian terbaru terhadap penderita HIV, acemannan meningkatkan jumlah sel darah putih dan memperlihatkan gejala klinik yang lebih baik.⁶³

Pada studi lain, pemberian ekstrak aloe pada kaki babi yang diinfeksi dengan *Trichophyton mentagrophytes* mampu meningkatkan fagositosis dan menghambat pertumbuhan jamur 70% dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak tersebut,⁶⁴ selain itu ekstrak aloe juga meningkatkan fagositosis pada anak-anak yang menderita asthma.⁶⁵

2.6.6 Efek Farmakologi *Aloe vera*

Sampai saat ini telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui efektivitas AV dan terbukti mempunyai efek yang sangat luas. Pemanfaatan dan aktivitasnya secara klinis di bidang : Gastrointestinal, Endokrin (hipoglikemia), Antimikrobia, dan Antineoplastik. Uraianya adalah sebagai berikut :

a. Gangguan Gastrointestinal

Efek AV terhadap gangguan gastrointestinal adalah menstimulasi laksatif (*leaf lining*) (1), efek terhadap lambung dan ulserasi duodenal (gel)(2), *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) (gel)(3).

Laksatif (1). Bagian AV yang digunakan adalah lapisan daun, mengandung: barbaloin, atau aloin, merupakan derivat dari bagian dalam pelepah daun, yang berasa pahit. Studi in vitro menunjukkan bahwa aloe mempengaruhi pompa sodium/potassium dan *channel chlorida* pada membran sel.^{66,67} Sedangkan pada hewan coba anthraquinon-aloe menstimulasi usus untuk mendorong dan mensekresi air (pada tikus).⁶⁸ Studi pada manusia ditemukan bahwa anthraquinon yang terdapat dalam getah AV menstimulasi eksresi chlorida dan air ke dalam usus besar, juga berperan menghambat reabsorpsi.^{69,70} Efek senyawa tersebut bekerja 6–12 jam setelah pemberian dosis tunggal secara oral yang dapat menyertai kram hebat, mencret-berdarah, dan mual. Penelitian dengan metode RCT (*Randomized Control Trial*) menemukan bahwa *antraquinones* berpotensi sebagai obat pencahar hebat pada anak yang menderita sembelit kronis.⁷

Efek terhadap lambung dan ulserasi duodenal (2). Bagian yang digunakan adalah gel.⁷¹ Pada hewan coba (tikus dan mencit), AV menghambat

sekresi asam lambung. Mempunyai efek protektif terhadap kerusakan mukosa lambung.⁷² Pemberian awal ekstrak AV mampu mereduksi 70% mukosa lambung yang diinduksi aspirin pada mencit.⁷³ Selain itu AV juga mensupresi efek ulserogenik pada tikus yang mengalami stress.⁷⁴ Terhadap manusia, efek AV terbukti mampu mencegah ulserasi usus, namun tidak ada data kelompok pembanding dengan pasien yang tidak mendapat perlakuan.⁷⁵

Inflamatory Bowel Disease (IBD) (3). Bagian yang digunakan untuk pemulihan adalah gel AV,^{76,77} tapi belum ada data penunjang yang menyebutkan tentang hal tersebut.

b. Endokrin (hypoglikemia)

Bagian yang digunakan adalah gel AV. Dalam beberapa kasus pada mencit yang mengalami diabetes, AV mampu menurunkan kadar gula darah.^{78,79} Pada beberapa penelitian, gel AV mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus normal maupun yang diabetes.⁸⁰ Gel AV ini mampu memacu efek hypoglikemia jika diberikan secara oral dengan dosis 2 kali sehari, 1–2 sendok makan.⁸¹ Belum ada laporan yang menyebutkan tentang pembandingan terhadap beberapa agen hypoglikemik atau insulin, dan efek keracunan dari produk AV pada pasien yang mendapat terapi medik terhadap kontrol glikemia.

c. Antimikrobia

Gel AV memiliki aktivitas anti-bakterial, anti-viral, anti-fungal. Aktivitas anti-bakterial, berdasarkan data invitro, menyebutkan bahwa AV mempunyai efek *bacteriostatic* dan *bactericidal*. Umumnya efektif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia*, *Marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas aeruginosa, *E. Coli* dan *Mycobacterium tuberculosis*. Aloe-emodin juga mampu menghambat pertumbuhan *Helicobacter pylori*, tergantung pada dosis yang digunakan.⁸² Pemakaian pada manusia belum dilaporkan.

Acemannan yang bekerja sendiri atau kombinasi dengan azidothymidine (AZT) mampu menghambat perkembangbiakan virus herpes dan AIDS (in vitro),^{52,53,54} sedangkan pada hewan coba belum diketahui. Dosis yang digunakan dalam perlakuan ini (HIV) dapat mencapai 250 miligram QID (satu bagian dari aloe gel mentah setiap hari).⁵⁵ Penelitian dengan metoda RCT pada anak-anak yang terinfeksi HIV dengan jumlah CD₄ yang rendah, memperlihatkan bahwa aloe tidak berpengaruh secara signifikan terhadap jumlah CD₄, level antigen p24, dan aktivasi virus,^{83,84} sedangkan penelitian dengan metoda *randomized controlled double blind clinical trial* menyebutkan bahwa 60 dari pasien laki-laki yang terinfeksi Virus Herpes simplex, dengan pemberian ekstrak aloe (0,5%) dalam bentuk *cream hydrophilic* mampu mempercepat penyembuhan dan mengurangi lesi dibandingkan dengan kelompok placebo.⁸⁵

d. Antineoplastik

Untuk terapi kanker digunakan gel AV. Data in vitro menyebutkan bahwa aloin A dan B, aloesin, aloeresin sama sekali tidak mempunyai aktivitas antitumor, tapi aloe-emodin menyebabkan sitostatik, efek nekrotik terhadap *cell line leucemia K562* pada manusia.⁸⁶ Pada hewan coba, acemannan yang dikandung aloe mempunyai aktivitas terhadap virus feline leukemia dan tumor padat.^{50,87,88,89,90,91,92}

Masuknya kuman intraselluler (*Salmonella typhimurium*) akan merangsang respon imun tubuh. Respon imun tersebut dapat berupa respon imun alamiah dan respon imun spesifik. Respon imun yang berperan terhadap bakteri intraselluler adalah respon imun selluler yang dilakukan oleh makrofag teraktivasi, sel limfosit T sitotoksik (T CD8⁺) dan sel NK yang akan melakukan *killing* untuk mengeliminasi bakteri.

Salmonella typhimurium yang masuk kedalam tubuh akan difagosit oleh makrofag. Makrofag berperan sebagai *Antigen Presenting cell* (APC) yaitu sel yang memproses dan menyajikan fragmen dari mikroorganisme dalam bentuk ikatan dengan molekul MHC kelas II ke permukaan sel yang akan dikenali oleh limfosit Tho.

Bakteri intraselluler akan menstimulasi makrofag untuk memproduksi TNF- α , IL-12, dan IL-1. TNF- α berperan mengaktivasi makrofag, IL-12 yang diproduksi oleh makrofag merupakan aktifator poten bagi sel NK untuk memproduksi IFN- γ yang berperan memacu fungsi *microbicidal* makrofag dengan menstimulasi sintesis ROI dan NO dan mengaktifkan transkripsi gen yang mengkode enzim-enzim yang dibutuhkan untuk membentuk ROI dan RNI yang berperan untuk *bacterial killing*.

Disamping itu bakteri intraselluler juga akan menginduksi perkembangan sel T menjadi fenotip sel Th1 dan Th2. Sel Th1 akan mensekresi IL-2 yang menyebabkan proliferasi dan diferensiasi CD8⁺, sel B dan sel Th untuk melakukan proses *killing*, sedangkan IFN- γ akan mengaktivasi makrofag untuk melakukan proses fagositosis dan *killing* mikroorganisme.

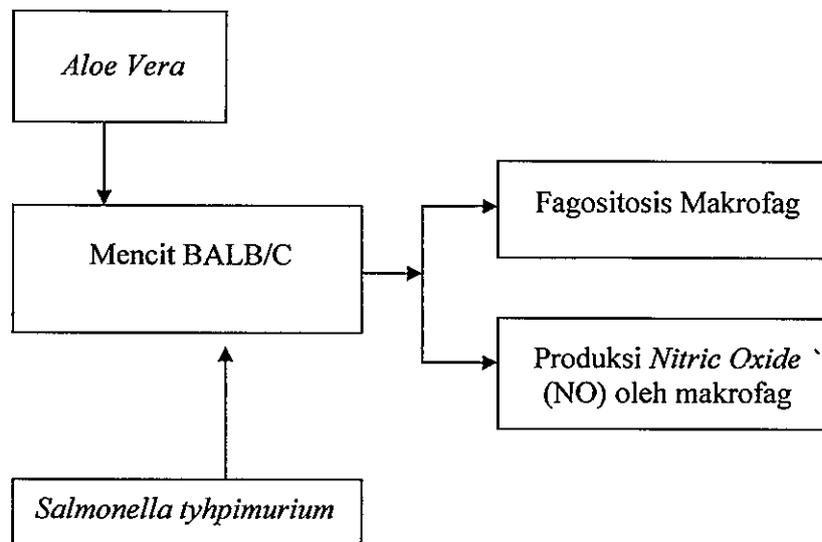
Sel Th2 akan merangsang sel B untuk memproduksi imunoglobulin (Ig) yang akan membantu proses opsonisasi sehingga mudah difagosit oleh makrofag.

Makrofag yang teraktivasi ditandai dengan peningkatan kemampuan fagositosis, pembentukan NO dan ROI yang berperan dalam proses *killing* terhadap mikroorganisme intraselluler.

Aloe vera yang berperan sebagai imunostimulator mempunyai titik tangkap : memacu dan meningkatkan aktivitas makrofag, menstimulasi sel T CD8⁺, memacu kemampuan fagositosis, memacu aktivitas *microbicidal* makrofag, selain itu memacu makrofag untuk melepas IL-1, TNF- α dan produksi NO.

Namun demikian antara respon imun alamiah dan respon imun spesifik merupakan suatu *network*.

3.2 KERANGKA KONSEP



Jus *Aloe vera* diberikan pada mencit BALB/C selama 9 hari, kemudian pada hari ke-6 diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*. Pemeriksaan fagositosis makrofag dan NO makrofag dilakukan 4 hari *pasca* infeksi.

BAB 4

HIPOTESIS

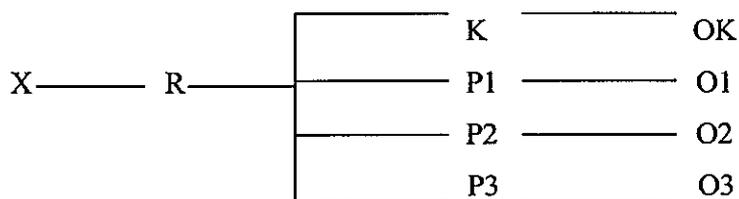
1. Kemampuan fagositosis makrofag lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi jus *Aloe vera* dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Produksi NO makrofag lebih tinggi pada kelompok mencit yang diberi jus *Aloe vera* dibandingkan dengan kelompok kontrol.

BAB 5

METODA PENELITIAN

5.1 RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan rancangan *The Post Test-only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian berbagai dosis jus *Aloe vera* dengan keluaran (*outcome*) berupa kemampuan fagositosis makrofag dengan menghitung jumlah partikel *latex beads* yang difagosit oleh makrofag (Indeks fagositosis) dan produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag.



Keterangan:

X → R : Masa adaptasi 1 minggu

R : Randomisasi

K : Kontrol, sebagai pembanding mencit hanya mendapat pakan standar dan diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU intra peritoneal pada hari ke-6.

P1 : Mencit diberi jus *Aloe vera* dengan dosis 0,1 ml peroral setiap hari selama 9 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* dosis 10^5 CFU intra peritoneal pada hari ke-6.

- P2 : Mencit diberi jus *Aloe vera* dengan dosis 0,3 ml peroral setiap hari selama 9 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P3 : Mencit diberi jus *Aloe vera* dengan dosis 0,5 ml peroral setiap hari selama 9 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.

5.2 TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Mikrobiologi, Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan di Laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada pada bulan Juli sampai September 2004.

5.3 POPULASI DAN SAMPEL

5.3.1 POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit betina strain BALB/c berusia 8-10 minggu dengan berat 20-30 gram. Strain yang dipilih adalah BALB/c sebab strain ini pada umur 6-12 minggu telah dilaporkan dapat menimbulkan respon imunitas seluler apabila mencit diinokulasi dengan *Salmonella typhimurium* hidup. Mencit strain BALB/c juga *susceptible* terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*.⁹³

5.3.2 SAMPEL

a. Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan ditentukan besarnya dengan rumus Federer yaitu : $(t - 1) (r - 1) \geq 15$, dimana t = perlakuan dan r = jumlah ulangan. Dalam penelitian ini jumlah perlakuan adalah 4, sehingga jumlah sampel perkelompok perlakuan harus lebih dari 5. Pada penelitian ini menggunakan 6 ekor mencit per

kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan untuk penelitian eksperimental laboratorik sebanyak 24 ekor mencit.

b. Kriteria Inklusi

- Mencit BALB/c betina
- Mencit dalam keadaan sehat, aktivitas dan tingkah laku normal
- Umur 8-10 minggu
- Berat badan 20-30 gr

c. Kriteria Eksklusi

- Gerakan mencit tidak aktif
- Bobot tikus menurun
- Tikus mati dalam masa penelitian

d. Cara Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari mencit yang secara genetik sifatnya sama, maka pengambilan secara random atau tidak, bukan merupakan masalah. Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak dan dilakukan penimbangan mencit sebelum dan sesudah perlakuan.

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 mencit diadaptasikan selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Setelah menjalani masa adaptasi, kemudian mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, masing-masing terdiri dari 6 ekor yaitu kelompok K, P1, P2, P3.

5.4 VARIABEL PENELITIAN

5.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian jus *Aloe vera* dengan dosis bervariasi (0,1ml/hari, 0,3ml/hari, 0,5 ml/hari). Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis yang telah dikonversi dari kisaran dosis jus *Aloe vera* untuk tikus ke mencit yaitu sebesar 0,4-3 ml.^{94,95}

5.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah :

- a. Kemampuan fagositosis makrofag diperiksa dengan menggunakan partikel *latex beads*.⁹⁶
- b. Produksi NO makrofag, diukur dari jumlah NO (μM) dari supernatan kultur makrofag 24 jam menggunakan reagen Griess dengan metoda modifikasi Griess dari Green dkk (1982) dan Ding dkk (1988).⁹⁷ Hasil reaksinya dibaca dengan *Elisa reader*.

5.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah *Salmonella typhimurium* sebagai imunogen. *Salmonella typhimurium* yang digunakan adalah strain *Salmonella virulen (Phage type 510)* dengan dosis $\text{LD}_{50} 10^6$, sehingga dosis yang digunakan untuk pemeriksaan imunitas selluler adalah 10^5 .²²

5.5 ALAT, BAHAN DAN REAGEN PENELITIAN

5.5.1 Alat/Instrument Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : mikroskop, spuit *disposable* 1 cc, 10 cc, timbangan elektrik, objek glass, tabung reaksi, kandang hewan coba, *yellow* dan *blue* tip, incubator CO₂ 5%, seperangkat alat-alat bedah steril, *laminar air flow*, *Elisa reader*, pipet *Pasteur*, pipet *Eppendorf*, bilik hitung *Neubauer Improve*, sentrifugasi sigma 310 AK yang dilengkapi pengatur suhu, *micro plate 24 well*, *96 well* dasar rata, *thermanox plastic coverslip* diameter 13 mm, *falcon blue max* 15 ml polypropylene conical tube.

5.5.2 Bahan dan Reagen Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *Peritoneal Exudate Cell* (PEC) mencit betina strain BALB/C berumur 8-10 minggu, sehat, aktivitas dan tingkah laku normal, diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi UGM Yogyakarta. Selama penelitian mencit tidak sakit dan mengalami diare atau mati. Mencit diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*, kuman *Salmonella typhimurium* diperoleh dari RS.Telogorejo Semarang.

Bahan perlakuan adalah jus *Aloe vera* 0,1 ml, 0,3 ml, 0,5 ml yang diberikan peroral selama 9 hari.

Reagen yang dibutuhkan adalah: larutan *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) komplet, *Bovine Serum* (FBS) 10%, alkohol 70%, penicillin, asam asetat 3%, *Latex beads*, methanol absolute, Giemsa 20%, *Phosphate Buffered Saline*

(PBS), Reagen Griess (reagen *chromogenic*), *Canada Balsam*, aquadest steril, media *Salmonella-Shigella* (SS), media *Brain Heart Infusion* (BHI).

5.5.3 PROSEDUR PEMBUATAN JUS *Aloe vera*

- Pembuatan jus *Aloe vera* dilakukan dengan mengambil bagian daging (gel) daun.
- Kemudian dicuci bersih dan dibuang lapisan luar yang berwarna hijau kekuningan (*latex leaf lining*).
- Selanjutnya diblender, tanpa penambahan air, kemudian disaring.

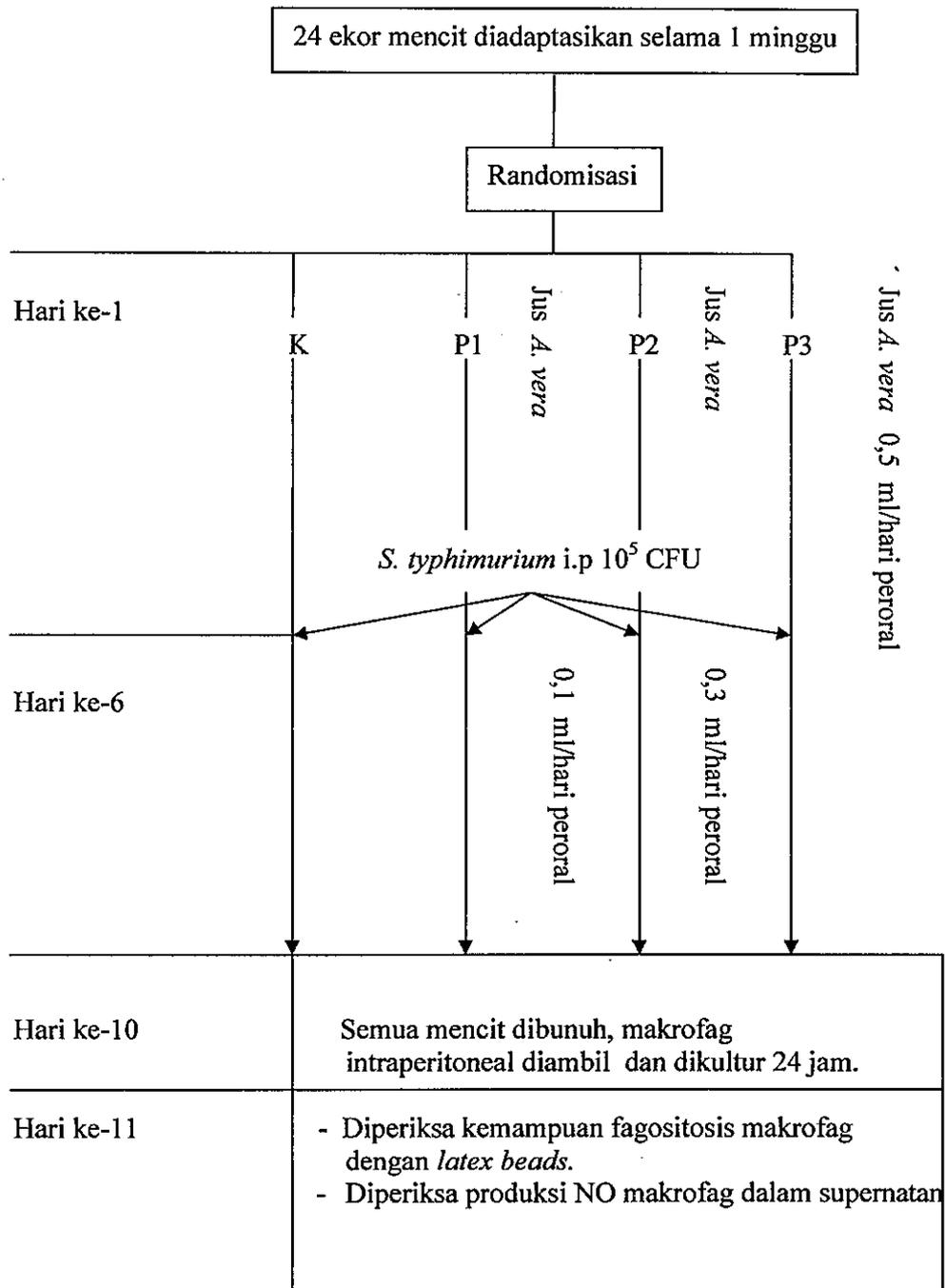
5.6 PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- 24 ekor mencit betina strain BALB/c, umur 8-10 minggu diaklimatisasikan di laboratorium dengan cara dikandangkan secara memadai dan diberi ransum pakan standar selama 1 minggu secara *ad libitum*.
- Mencit tersebut dikelompokkan menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor mencit yang ditentukan dengan cara acak, lalu dikandangkan perkelompok.
- Setiap kelompok diberi pakan standar yang sama dan dilakukan penimbangan berat badan sebelum dan sesudah perlakuan.
- Kelompok kontrol (K) : mencit hanya mendapat diet standar selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh diambil makrofagnya untuk dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag.

- Kelompok P1 : mencit mendapat diet standar dan jus *Aloe vera* dengan dosis 0,1 ml peroral setiap hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh diambil makrofagnya untuk dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag.
- Kelompok P2 : mencit mendapat diet standar dan jus *Aloe vera* dengan dosis 0,3 ml peroral setiap hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh diambil makrofagnya untuk dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag.
- Kelompok P3 : mencit mendapat diet standar dan jus *Aloe vera* dengan dosis 0,5 ml peroral setiap hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh diambil makrofagnya untuk dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag.

5.7 ALUR KERJA

5.7.1 ALUR KERJA PENELITIAN



5.8 PROSEDUR PEMERIKSAAN KEMAMPUAN FAGOSITOSIS DAN PRODUKSI NO MAKROFAG

5.8.1 Prosedur Isolasi Makrofag Mencit⁹⁶

Prosedur dibawah ini dilakukan untuk mendapatkan 5×10^5 sel/ml.

Mencit dimatikan dengan dislokasi cervix. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan selubung peritoniumnya dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian diinjeksikan 10 cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum. Peritoneum dipijat pelan untuk mendapatkan makrofag yang cukup banyak. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan dalam tabung falcon 15 cc. Cairan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4° C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah sel dicuci dengan PBS sampai bersih.

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium RPMI komplit yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10% ditambah penicillin pada pellet yang didapat. Sel-sel dihitung dengan hemositometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisiskan sel darah merah, kemudian diresuspensikan lagi dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Setelah itu sel dikultur dalam medium komplit di dalam *microplate 24 well* yang bawahnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (*coverslip*), setiap sumuran 200 µl (kepadatan 5×10^5 sel/ml), kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml tiap sumuran dan diinkubasikan lagi selama 2 jam. Setelah itu sel

dicuci RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplet 1 ml tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

5.8.2 Prosedur Pemeriksaan Fagositosis Makrofag Dengan *Latex Beads*⁹⁶

- Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi coverslip bulat, setiap sumuran 200 μ l (5×10^5 sel), diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% 37° selama 30 menit.
- Tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, inkubasikan selama 2 jam.
- Sel dicuci dengan RPMI 2x, kemudian tambahkan medium komplet 1ml/sumuran, inkubasikan selama 24 jam.
- Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci dengan RPMI 2x.
- *Latex beads* diresuspensikan sehingga mendapatkan konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml
- Tambahkan suspensi *latex* 200 μ l/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada inkubator CO₂ 5% 37°
- Cuci 3x dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit.
- Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan methanol absolute
- Setelah kering, coverslip dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit
- Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar.
- Setelah kering *dimounting* pada *object glass*
- Kemampuan fagositosis dihitung dari prosentase sel yang memfagosit partikel latex yang dihitung pada 200 sel dikali dengan jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan sebagai **indeks fagositosis**.⁹⁸

5.8.3 Prosedur Pemeriksaan Produksi NO Dalam Supernatan Kultur Makrofag⁹⁷

Untuk memeriksa produksi Nitrit digunakan 96 sumuran *microplate ELISA* dengan dasar rata. Caranya adalah sebagai berikut :

- Masukkan 100 μ l reagen Griess (reagen *chromogenic*) dalam setiap sumuran
- Pipet 100 μ l supernatan yang akan dites atau standar NaNO ke dalam plate dengan tripikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blangko.
- Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan stabilisasi.
- Ukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (misal Bio-Tek Model EL312).
- Buat kurva standar menggunakan analisis regresi linear sederhana/simpel dari pembacaan standar NaNO. Hitung konsentrasi Nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi.

Adapun cara pembuatan reagen *chromogenic* dan standar adalah sebagai berikut :

Reagen Chromogenic

Merupakan campuran 1 volume Reagen I dan 1 volume Reagen II sbb:

Reagen I : N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 0,1 g dilarutkan dalam 100 ml air suling.

Reagen II : Sulfanilamide 1.0 g dilarutkan dalam 100 ml *phosphoric acid* 5%.

Reagen I dan II tersebut harus disimpan dalam lemari pendingin, dalam wadah gelap dan digunakan sebelum 6 minggu/sebelum reagen berubah warna menjadi gelap. Setiap kali pemeriksaan harus disiapkan dalam keadaan fresh (segar).

Standar

Larutkan 69 mg NaNO_2 dalam 500 ml air suling (stok 2 mM)

Buat pengenceran bertingkat dari 0-200 μM dengan cara melarutkan larutan stok dengan medium yang sama dengan medium kultur.

5.9 Definisi Operasional Variabel

- a. Pemberian *Aloe vera* peroral adalah pemberian *Aloe vera* dalam bentuk jus tanpa penambahan air.
- b. Kemampuan fagositosis makrofag adalah : prosentase sel yang memfagosit partikel *latex* yang dihitung pada 200 sel dikali dengan jumlah rata-rata partikel *latex* pada sel yang positif dan dinyatakan sebagai Indeks Fagositosis
- c. Produksi *Nitric Oxide* (NO) adalah konsentrasi NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag yang diukur dengan reagen Griess dengan satuan μM .

6.0 ANALISA DATA

Sebelum dilakukan uji hipotesis, data yang terkumpul terlebih dahulu di-*edit*, di-*coding*, di-*entry* dalam file computer dan di-*cleaning*, setelah itu dilakukan analisis statistik deskriptif dan analitik.

UPT-PUSTAK-UNDIP

Dalam analisis deskriptif, dihitung nilai kecenderungan sentral (*mean* dan *median*) dan sebaran (SD) dari variabel tergantung (kemampuan fagositosis makrofag dan kadar NO). Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel silang. Dibuat grafik *box-plot* menurut kelompok perlakuan. Untuk menilai normalitas dari variabel tergantung dilakukan uji *Shapiro-Wilk*.

Data kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan sebagai indeks fagositosis, dianalisis menggunakan *One-way ANOVA* dilanjutkan dengan uji Bonferoni sedangkan produksi NO makrofag teraktivasi dianalisa dengan uji non parametrik Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Analisis statistik dibantu dengan program *SPSS 12 for windows*.⁹⁹ Nilai signifikansi dalam penelitian ini apabila variabel yang dianalisa memiliki $P < 0,05$.

BAB 6

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

6.1 HASIL PENELITIAN

6.1.1 Kemampuan Fagositosis Makrofag

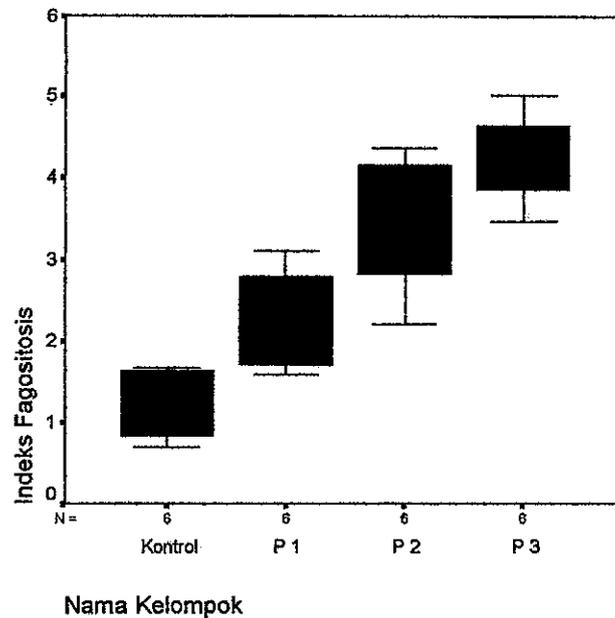
Kemampuan fagositosis makrofag dinyatakan sebagai indeks fagositosis.

Gambar fagositosis makrofag dapat dilihat pada lampiran 1a-d. Hasil pembacaan disajikan pada gambar 4 dan analisisnya pada tabel 1 dan 2 :

Tabel 1. Hasil Analisis Indeks Fagositosis Makrofag

Kelompok Perlakuan	N	Rerata \pm SD	Median	Standar Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Bawah	Batas Atas		
K	6	1,14 \pm 0,41	1,03	0,16	0,71	1,58	0,68	1,67
P1	6	2,31 \pm 0,60	2,31	0,24	1,67	2,94	1,59	3,12
P2	6	3,45 \pm 0,83	3,57	0,34	2,57	4,33	2,22	4,36
P3	6	4,28 \pm 0,57	4,35	0,23	3,68	4,88	3,46	5,01

Dari tabel 1 dan gambar 4 terlihat bahwa kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan sebagai indeks fagositosis paling tinggi terdapat pada kelompok P3, yaitu kelompok mencit yang diberi jus *Aloe vera* 0,5 ml/hari peroral, mencapai 4,28 \pm 0,57, sedangkan terendah didapatkan pada kelompok kontrol, yaitu kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan jus *Aloe vera* (1,14 \pm 0,41).



Gambar 4. Grafik Boxplot Indeks Fagositosis Makrofag

Pada grafik *boxplot* indeks fagositosis makrofag diatas terlihat bahwa kemampuan fagositosis makrofag makin meningkat seiring dengan peningkatan dosis jus *Aloe vera* (*dose-response relationship*). Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang nyata antara dosis jus *Aloe vera* dengan aktivitas fagositosis makrofag.

Setelah dilakukan analisis statistik, diketahui bahwa distribusi data indeks fagositosis adalah berdistribusi normal (Lampiran 1), sehingga uji hipotesisnya menggunakan *One-way ANOVA* dilanjutkan dengan uji Bonferoni. Dari uji ANOVA diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,0001$) pada indeks fagositosis makrofag antar kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 kelompok. Perbedaan lebih lanjut antar kelompok perlakuan, dianalisis menggunakan uji Bonferoni, seperti yang terdapat pada tabel 2 di bawah ini :

Tabel 2. Hasil Uji Bonferoni Terhadap Indeks Fagositosis Makrofag

(I) Nama Kelompok	(J) Nama Kelompok	Rata-rata perbedaan (I-J)	Std. Error	Nilai p	Interval Kepercayaan 95%	
					Batas Bawah	Batas Atas
Kontrol	P 1	-1,16 *	,36	,02	-2,21	-,10
	P 2	-2,30 *	,36	,00	-3,36	-1,24
	P 3	-3,13 *	,36	,00	-4,19	-2,07
P 1	Kontrol	1,16 *	,36	,02	0,10	2,21
	P 2	-1,14 *	,36	,02	-2,20	-,08
	P 3	-1,97 *	,36	,00	-3,03	-,91
P2	Kontrol	2,30 *	,36	,00	1,24	3,36
	P 1	1,14 *	,36	,02	,08	2,20
	P 3	-,82	,36	,19	-1,88	,22
P3	Kontrol	3,13 *	,36	,00	2,07	4,19
	P 1	1,97 *	,36	,00	,91	3,03
	P 2	,82	,36	,19	-,22	1,88

* Berbeda nyata pada taraf 5%

Dari tabel 2 diatas terlihat dengan jelas bahwa kelompok perlakuan baik P1 ($p=0,026$) (kelompok mencit yang diberi perlakuan jus *Aloe vera* 0,1 ml/hari/peroral), P2 ($p<0,0001$) (kelompok mencit yang diberi perlakuan jus *Aloe vera* 0,3 ml/hari/peroral), P3 ($p<0,0001$) (kelompok mencit yang diberi perlakuan jus *Aloe vera* 0,5 ml/hari/peroral) jika dibandingkan dengan kontrol (kelompok mencit yang tidak mendapat perlakuan jus *Aloe vera*) maka didapatkan perbedaan yang signifikan ($p<0,0001$). Dari uji *One-way ANOVA* yang dilanjutkan dengan Uji Bonferoni terlihat bahwa *Aloe vera* dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag. Hal ini dapat dilihat dari rata-rata kemampuan fagositosis setiap kelompok lebih besar dan berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($1,14 \pm 0,41$). Dari semua kelompok yang diberi perlakuan *Aloe vera* seluruhnya berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol, yaitu: kelompok P1, P2 dan P3. Demikian juga antara kelompok P1 dengan P2

($p=0,029$) serta P1 dengan P3 ($p<0,0001$). Sedangkan kemampuan fagositosis makrofag antara kelompok P2 dengan P3 tidak berbeda bermakna. Dari hasil penelitian dapat dilihat bahwa kemampuan fagositosis makrofag mencit BALB/C yang mendapat perlakuan berbagai dosis jus *Aloe vera*, lebih tinggi dan berbeda bermakna dibandingkan dengan mencit yang tidak diberikan jus tersebut.

6.1.2 Produksi Nitric oxide Makrofag

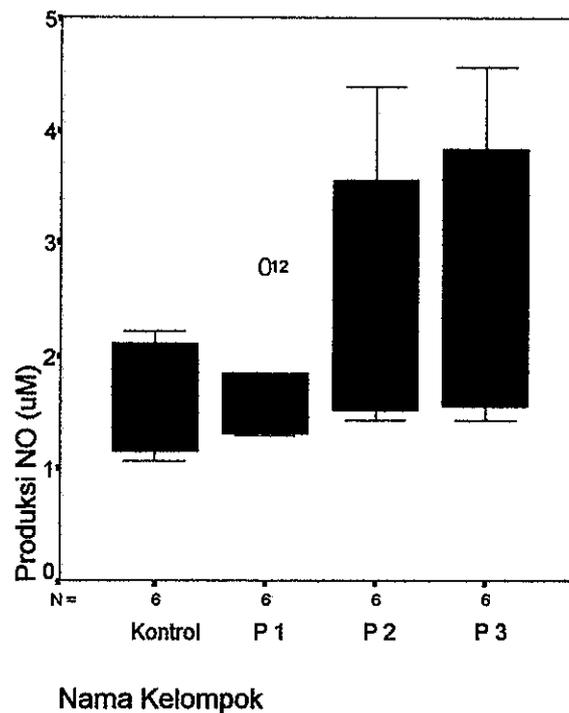
Produksi NO makrofag diukur dari supernatan kultur makrofag masing-masing kelompok dengan reagen Griess dengan satuan μM . Hasil pemeriksaan produksi NO makrofag ditampilkan pada gambar 5 dan hasil analisisnya disajikan pada tabel 3 dan tabel 4 :

Tabel 3. Hasil Analisis Produksi Nitric Oxide (NO)

Kelompok Perlakuan	N	Rerata \pm Standar Deviasi	Median	Standar Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Bawah	Batas Atas		
Kontrol	6	1,52 \pm 0,50	1,32	0,20	0,99	2,06	1,06	2,21
P1	6	1,71 \pm 0,57	1,52	0,23	1,11	2,32	1,29	2,79
P2	6	2,43 \pm 1,23	1,87	0,50	1,14	3,73	1,42	4,38
P3	6	2,74 \pm 1,24	2,54	0,50	1,43	4,04	1,42	4,55

Dari hasil pemeriksaan tampak bahwa produksi NO makrofag tertinggi ditemukan pada kelompok P3, dimana produksi NO pada masing-masing kelompok perlakuan (P1, P2, P3), yaitu kelompok P1 : 1,71 \pm 0,57 μM , kelompok

P2 : $2,43 \pm 1,23 \mu\text{M}$, P3 : $2,7 \pm 1,24 \mu\text{M}$ lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol : $1,52 \pm 0,50 \mu\text{M}$.



Gambar 5. Grafik *Boxplot* Produksi Nitric Oxide

Pada grafik *boxplot* diatas terlihat bahwa produksi NO makrofag antara kelompok kontrol dengan P1 dan P2 didapatkan peningkatan NO yang tidak berbeda bermakna, sedangkan antara kelompok kontrol dengan P3 didapatkan peningkatan NO yang berbeda bermakna. Pemberian dosis jus *Aloe vera* 0,1 ml, 0,3 ml belum mampu meningkatkan produksi NO secara bermakna, sedangkan pemberian dosis 0,5 ml mampu meningkatkan produksi NO secara bermakna. Peningkatan produksi NO makrofag kelompok P2 dengan P3 tidak berbeda bermakna.

Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, ternyata didapatkan perbedaan yang tidak nyata ($p=0,112$) pada produksi NO makrofag antar kelompok perlakuan. Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut antar kelompok perlakuan dianalisis dengan menggunakan uji *Mann-Whitney* (tabel 4). Perbedaan bermakna tidak didapatkan antara kelompok kontrol dengan kelompok P1 ($p=0,423$), kelompok kontrol dengan P2 ($p=0,150$), tetapi didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan P3 ($p=0,037$).

Berdasarkan hal tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa produksi NO makrofag kelompok P1, P2 mengalami peningkatan yang tidak bermakna, bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi pada kelompok P3 berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian jus *Aloe vera* dengan dosis 0,5 ml/peroral/hari dapat meningkatkan produksi NO makrofag secara bermakna pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Tabel 4. Hasil Uji Mann Whitney Terhadap Produksi NO

	K	P1	P2	P3
K		0,42	0,15	0,03 *
P1	0,42		0,20	0,10
P2	0,15	0,20		0,52
P3	0,03 *	0,10	0,52	

6.2 PEMBAHASAN

6.2.1 Kemampuan Fagositosis Makrofag

Variabel respon imun seluler yang dinilai dalam penelitian ini adalah aktivitas makrofag sebagai fagosit profesional. Makrofag melakukan sebagian besar fungsi efektor, setelah sel itu diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lainnya. Proses fagositosis dimulai dengan kemotaksis diikuti adhesi, penelanan (ingesti), pencernaan sampai pembunuhan (*killing*).^{2,3,26}

Pemberian jus *Aloe vera* pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* ternyata mampu mengaktivasi makrofag yang ditandai dengan meningkatnya kemampuan fagositosis makrofag dibanding pada mencit kontrol. Dalam penelitian ini kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan sebagai indeks fagositosis meningkat secara signifikan ($p < 0,0001$) pada semua kelompok perlakuan dengan pemberian jus *Aloe vera* (0,1 ml/hari, 0,3 ml/hari, 0,5 ml/hari), sedangkan indeks fagositosis tertinggi terdapat pada kelompok P3 (0,5 ml/hari), setiap penambahan dosis jus *Aloe vera*, mampu meningkatkan indeks fagositosis secara bermakna. Hal ini sejalan dengan efek pemaparan acemannan (kandungan aktif *Aloe vera*) terhadap makrofag, dimana acemannan mampu meningkatkan *respiratory burst* (RB), fagositosis dan aktivitas *candidicidal*. Peningkatan fungsi makrofag berasosiasi dengan *binding mannosylated bovine serum albumin* (m-BSA) terhadap reseptor mannose-makrofag.¹⁸ Selain itu, efek acemannan terhadap makrofag *cell line* RAW 264,7, memperlihatkan hasil bahwa acemannan memacu fungsi makrofag, memacu makrofag melepas interleukin 6 (IL-6), TNF- α dan IFN- γ , produksi NO dan ekspresi molekul permukaan, sedangkan sitokin-sitokin

yang dipacu tersebut tergantung pada dosis yang digunakan, disamping itu perubahan morfologis sel dan respon ekspresi antigen permukaan meningkat akibat stimulasi campuran acemannan dan IFN- γ .¹³ Diperkirakan bila kemampuan fagositosis meningkat maka produksi sitokin-sitokin yang mengaktivasi makrofag juga meningkat. Pada penelitian lain, acemannan merupakan imunostimulator yang penting dalam meningkatkan respon limfosit terhadap alloantigen, meliputi mekanisme memacu monosit melepas IL-1. Kemampuan ini diuji terhadap infeksi virus pada binatang dan manusia. Selain itu pemberian acemannan pada pasien yang terinfeksi HIV-1 mampu meningkatkan sirkulasi monosit/makrofag, meningkatkan aktivitas fagositosis, sehingga mampu memperbaiki MWR secara signifikan.¹⁴

Pada penelitian ini tidak digunakan senyawa aktif *Aloe vera* (acemannan) karena *Aloe vera* mengandung berbagai senyawa yang bekerja seperti sebuah konduktor yang menghasilkan sinergisme dengan berbagai komponen aktif atau dengan berbagai komponen biologis lainnya, sehingga digunakan jus *Aloe vera*.

Dalam penelitian ini terbukti bahwa kemampuan fagositosis makrofag kelompok mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* yang diberi berbagai dosis *Aloe vera* lebih tinggi dibanding kelompok yang tidak diberi jus *Aloe vera*.

6.2.2 Produksi Nitric Oxide

Dari perlakuan jus *Aloe vera* yang diberikan terhadap mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi NO makrofag kelompok perlakuan (P1, P2, P3) lebih tinggi dibandingkan dengan

kelompok kontrol walaupun peningkatan tersebut tidak berbeda bermakna, sedangkan pemberian dosis jus *Aloe vera* 0,5 ml/hari mampu meningkatkan produksi NO secara bermakna pada kelompok P3, bila dibandingkan antara kelompok P1, P2 dengan kontrol yang diberi 0,1 ml/hari, 0,3 ml jus *Aloe vera*.

Setelah proses fagositosis, makrofag akan membunuh bakteri dengan membentuk NO yang bersifat toksik terhadap bakteri. Pemberian jus *Aloe vera* dengan dosis 0,5 ml/hari meningkatkan produksi NO secara bermakna, sedangkan pemberian dengan dosis 0,1ml/hari dan 0,3 ml/hari meningkatkan produksi NO tapi tidak berbeda bermakna. Meningkatnya produksi NO ini juga berkaitan dengan meningkatnya aktifitas makrofag sebagai sel fagosit yang sesuai dengan hasil penelitian ini. Selain mengaktivasi makrofag, acemannan juga menginduksi sintesis NO melalui *macrophage mannose receptor* yang tergantung pada dosis pemakaian.¹⁷ Selain itu, asam amino yang dikandung *Aloe vera* juga mampu meningkatkan produksi NO oleh makrofag.²⁰ Dengan meningkatnya NO yang dihasilkan berarti akan meningkatkan pula efektivitas makrofag untuk melakukan aktivitas fagosit. Penelitian lain, menunjukkan bahwa selain menyebabkan aktivasi makrofag juga menginduksi sintesis NO, sinergis acemannan dengan IFN- γ , sangat meningkatkan sintesis NO pada *cell* RAW 204,7. Peningkatan ini diperkirakan karena meningkatnya ekspresi mRNA untuk menginduksi sintesis NO oleh makrofag.⁵¹

Dari hasil yang didapat pada penelitian diatas, perlu diperiksa pola tipe sitokin yang berperan dalam mengaktivasi makrofag yaitu IFN- γ atau IL-12 yang mengaktifasi sel Th1, sel NK, sel T CD⁸⁺.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

1. Pemberian jus *Aloe vera* dosis bervariasi (0,1 ml/hari/, 0,3 ml/hr, 0,5 ml/hari) meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag mencit BALB/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara bermakna dibandingkan dengan kontrol.
2. Pemberian jus *Aloe vera* dengan dosis 0,5 ml/hari, meningkatkan produksi *Nitric Oxide* (NO) secara bermakna sedangkan pemberian jus *Aloe vera* dengan dosis 0,1 ml/hari/, 0,3 ml/hr tidak meningkatkan produksi *Nitric Oxide* (NO) secara bermakna.
3. Semakin tinggi dosis jus *Aloe vera* yang diberikan maka kemampuan fagositosis makrofag juga makin meningkat (*dose-response relationship*).

Dari penelitian variabel tersebut diatas maka dapat disimpulkan bahwa jus *Aloe vera* dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi *Nitric Oxide* (NO) mencit BALB/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

7.2 SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melengkapi konsep pemikiran dalam penelitian ini antara lain :

1. Pemeriksaan histopatologi hepar dan lien.
2. Pemeriksaan sitokin-sitokin dari cairan peritoneal yang mengaktivasi makrofag khususnya IL-12, IFN- γ
3. Dilakukan penelitian terhadap *survival rate* mencit yang diberi perlakuan jus *Aloe vera* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

7.3 REKOMENDASI

Aloe vera telah banyak dimanfaatkan atau dipakai (internal) secara luas di masyarakat, maka direkomendasikan untuk dilakukan uji toksisitas terhadap pemakaian jus *Aloe vera* tersebut.

BAB 8

RINGKASAN

Penyakit demam typhoid adalah penyakit sistemik akut yang disebabkan oleh *Salmonella typhimurium* dan merupakan masalah kesehatan yang serius dengan angka mortalitas bervariasi.

Salmonella typhimurium merupakan mikroorganisme yang dapat hidup dan berkembangbiak dalam makrofag, tahan terhadap enzim-enzim lisosom, mempunyai kemampuan untuk mencegah dan menghambat fusi phagosom-lisosom sehingga tidak terjangkau oleh antibodi dalam sirkulasi. Salah satu cara untuk membunuh kuman tersebut adalah dengan memacu fungsi makrofag untuk *killing*. Untuk memacu fungsi makrofag tersebut, maka diperlukan suatu zat atau senyawa imunomodulator diantaranya dengan imunonutrisi seperti *Aloe vera* yang diketahui mempunyai kemampuan sebagai imunomodulator.

Permasalahan dalam penelitian ini dirumuskan : Apakah pemberian jus *Aloe vera* dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi *nitric oxide* (NO) makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus *Aloe vera* ?

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada pemberian berbagai dosis jus *Aloe vera* dibandingkan dengan yang tidak diberi jus *Aloe vera*.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik, dengan rancangan *The Post Test-Only control Group Design* menggunakan hewan coba mencit BALB/C yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi UGM, Yogyakarta, umur 8-10 minggu, sehat, berat badan 20-30 gr, jenis kelamin betina. Selama penelitian diberi pakan standar dan minium *ad libitum*.

Sebanyak 24 ekor mencit yang telah diadaptasi selama 1 minggu dibagi secara acak menjadi 4 kelompok perlakuan untuk pemeriksaan kemampuan fagositosis dan produksi NO yaitu ; K= kontrol ; P1= diberi jus *Aloe vera* 0,1 ml/hari peroral selama 9 hari ; P2= diberi jus *Aloe vera* 0,3 ml/hari peroral selama 9 hari ; P3= diberi jus *Aloe vera* 0,5 ml/hari peroral selama 9 hari. Semuanya diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 intraperitoneal pada hari ke-6 dan dibunuh pada hari ke-10. Setelah dibunuh dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag. Kemampuan fagositosis makrofag dihitung dari prosentase sel yang memfagosit partikel *latex* yang dihitung pada 200 sel dikali dengan jumlah rata-rata partikel *latex* pada sel yang positif dan dinyatakan sebagai Indeks Fagositosis, sedangkan produksi NO makrofag yang teraktivasi diukur dari supernatan kultur makrofag menggunakan reagen Griess dengan metoda modifikasi Griess dari Green dan Ding.

Data kemampuan fagositosis makrofag dianalisa dengan *One-way ANOVA* dilanjutkan dengan uji Bonferoni sedangkan produksi makrofag teraktivasi dianalisa dengan uji non parametrik Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian jus *Aloe vera* dosis bervariasi, yaitu 0,1 ml/hari (kelompok P1), 0,3 ml/hari (kelompok P2), 0,5 ml/hari (kelompok P3) dapat meningkatkan indeks fagositosis makrofag secara bermakna ($p < 0,0001$) dimana kemampuan fagositosis tertinggi terdapat pada kelompok P3. Hal ini menunjukkan bahwa jus *Aloe vera* dengan dosis diatas mampu menstimulasi aktivitas makrofag dengan mensekresi IL-12 dan memacu sel T CD4⁺ subset Th1 yang mensekresikan IFN- γ sehingga memperkuat mekanisme bakterisidal makrofag, yang ditandai dengan meningkatnya kemampuan fagositosis makrofag.

Pemberian jus *Aloe vera* dengan dosis 0,5 ml/hari terbukti meningkatkan produksi NO secara bermakna ($p = 0,037$) sedangkan pemberian jus *Aloe vera* dengan dosis 0,1 ml/hari, 0,3 ml/hari, mampu meningkatkan produksi NO tapi tidak berbeda bermakna. Meningkatnya produksi NO seiring dengan meningkatnya kemampuan fagositosis makrofag. Dengan meningkatnya NO yang dihasilkan berarti akan meningkatkan pula efektivitas makrofag untuk melakukan aktivitas fagosit. Peningkatan ini diperkirakan karena meningkatnya ekspresi mRNA untuk menginduksi sintesis NO oleh makrofag.

Berdasarkan hasil penelitian pada pengukuran ke-2 variabel tersebut diatas, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian jus *Aloe vera* dosis bervariasi dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dan produksi NO makrofag (dosis 0,5 ml/hari). Dengan demikian hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi akan peranan jus *Aloe vera* sebagai terapi nutrisi pada penyakit infeksi oleh kuman *Salmonella typhimurium* dan mempercepat penyembuhan.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Gasem MH. *Typhoid fever, clinical and epidemiological studies in Indonesia*. Thesis Nijmegen University, Netherlands. Semarang Indonesia Diponegoro University Press, 2001.
2. Kresno SB. *Immunologi : Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi Keempat. Jakarta, Balai Penerbit FK.UI, 2001 ; 1-131.
3. Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. Fourth Edition. Philadelphia ; WB Saunders CO, 2000 ; 1-16, 343-52.
4. Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial action of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effect on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med*, 2000 ; 192(2) : 227-236.
5. Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial action of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effect on microbial proliferation and host survival in vivo. *J Exp Med*, 2000 ; 192(2) : 237-48.
6. Erikson S, Bjorkman J, Borg S, Syk A, Petterson S, Anderson DI, Rhen M. *Salmonella typhimurium* mutants that downregulate phagocyte NO production. *Cell Microbiol*, 2000 ; 2(3) : 139-50.
7. Kathi J, Kemper MD, Chiou V. *Aloe vera*. Revised July 29, 1999. Longwood Herbal Task Force. Available from : URL : <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>
8. Ghazanfar SA. *Handbook of Arabian medical plants*. Boca Rato: CRC Press, 1994.
9. Elizabeth JB (Authors). *Aloe vera : Understanding it's proposed mechanism of action and clinical importance*. Available from : URL : http://www.podiatry.curtin.edu.au/encyclopedia/aloe_vera/
10. Immune enhancing properties : Direct and Indirect. Available from : URL : http://www.herbalanswers.com/ha_pages/direct.html

11. t'Hart LA, van Enkevort PH, Van Dijk H, Zaat R, de Silva KT, Labadie RP. Two functionally and chemically distinct immunomodulatory compounds in the gel of *Aloe vera*. *J Ethnopharmacol*, 1988 ; 23 : 61-71.
12. t'Hart LA, van den Berg AJ, Kuis L, van Dijk H, Labadie RP. An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of *Aloe vera*. *Planta Med*, 1999 ; 55 : 509-12.
13. Zhang L, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan : The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology*, 1999 ; 35/2 : 119-28.
14. Womble D, Helderman JH. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by acemannan (carrisyn). *Int J Immunopharmacol*, 1998 ; 10 : 967-74.
15. Womble D, Helderman JH. The impact of acemannan on the generation and function of cytotoxic T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1992 ; 14 : 63-77.
16. Marshall G, Druck J. In vitro stimulation of NK activity by acemannan (ACM). *J Immunol*, 1993 ; 150 : 1381.
17. Messel J, Denham D. The effect of carrisyn on the immune system. *Am Soc Exp Biol J*, 1998 ; 2 : 2239.
18. Stuart RW, Lefkowitz DL, Lincoln JA, Howard K, Gelderman MP, Lefkowitz SS. Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant acemannan. *Int J Immunopharmacol*, 1999 ; 19/2 : 75-82.
19. Marshall G, Gibbons A, Parnell L. Human cytokines induced by acemannan. *J Allergy Clin Immunol*, 1993 ; 91: 295.
20. Yagi A. Effect of amino acid in aloe extract on phagocytosis by peripheral neutrophils in adult bronchial asthma. *Jpn J. Allergol*, 1987 ; 6 (12) : 1094-1102.
21. Le TP, Hoffman SL. *Typhoid Fever*. Dalam : Tropical infectious disease : Principles, pathogens & practice. New York, Churchill Livingstone, 1999 ; 277-83.

22. Purwoko Y. Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap respon imun seluler mencit BALB/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Thesis Magister Ilmu Biomedik, Universitas Diponegoro, Semarang, 2003.
23. Gao XM, Tite JP, Lipscombe M Jones SR, Ferguson DJP, McMichael AJ. Recombinant *Salmonella typhimurium* strain that invade non phagocytic cells are resistant to recognition by antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun*, 1992 ; 60 (9) : 3780-9.
24. Janeway CA, Travers P, Waepert Muktamar NU ke-31, Shlomchik M. Immunobiology the immune system in health and disease. Fifth edition. New York, Churchill Livingstone, 2001 : 1 – 34.
25. Krause KH. *Professional Phagocytes* : Predators and prey of microorganism. *Scweiz Med Wochenschr*, 2000 ; 130 : 97-100.
26. Liwei Lu. *Introduction to health and disease block, non-specific defense mechanism*. Academic and Administration Block Faculty of Medicine Building, 2002.
27. Reis DS, Souza MA, Mineo JR, Espindola FS. Myosin and iNOS expression in enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2001 ; 34 (2) : 221-6.
28. Lesser CF, Miller S. *Salmonellosis*. Available from : URL : <http://www.harrisononline.com/>
29. Bobby J, Beth AC, McCormick, Bosley J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-dependent regulation of inducible NO synthase expression in macrophages by invasion SipB, SipC, SipD and effector SopE2. *Infection and Imunity*, 2000 ; 68 : 5567-5574.
30. Dherer D, Kok M, Obregon C, et.al. *Salmonella* virulence factor SipB induces activation and release of IL-18 in human dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002 ; 72 : 743-51.
31. Marcus SL, Knodler LA, Finlay BB. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effector SipD/SopB is membrane-associated and ubiquitinated inside host cells. *Cell Microbiol*, 2002 ; 4(7) 436-46.

32. Keuter M. Experimental studies on pathogenesis of Salmonella infection. Thesis. Katholike Universiteit Nijmegen, 1998.
33. Keusch GT. Salmonellosis. In: Fauci *et al.* Principles of internal medicine. 14th ed. USA: Mc Graw Hill Companies Inc, 1998 ; 950-3.
34. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Mikrobiologi untuk profesi kesehatan*. Editor: Bonang G. Edisi 16. Jakarta: EGC, 1992 ; 278-83.
35. Stewart FS. Biggers bacteriology and immunology for students of medicine. 9th ed. Norfolk Lowland Brydone Ltd, 1974 ; 353-63.
36. Schwacha MG, Meissler JJ Jr, Eisenstein TK. *Salmonella typhimurium* infection in mice induces nitric oxide-mediated immunosuppression through a natural killer cell-dependent pathway. *Infect Immun*, 1998 ; 66 (12) : 5862-6.
37. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. London New York. Gower Medical Publishing, 1997;10.1,18.1,18.3
38. McKee T, Mc Kee JR. Biochemistry. USA: Wim C. Brown Publisher, 1996.
39. Varesio L, Delgado IE, Gusella L, Cox GW, Melilo G, Muso T, Bosco MC. Role of cytokines in activation of monocytes. In: Aggarwall BB. Human cytokines : their role in disease and therapy. USA: Blackwell Science Inc, 1995 ; 61.
40. Huang J, DeGraves FJ, Lenz SD, Gao D, Feng P, Li D, Schlapp T, Kaltenboeck B. The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates chlamydia-induced disease. *Proc.Natl.Acad Sci*, 2002 ; 99 (6) : 3914-9.
41. Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, et al. Interleukin-18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 1999 ; 478-83.
42. MacFarlane AS, Schwacha MG, Eisenstein TK. In vivo blockage of nitric oxide with aminoquanidine inhibits immunosuppression induced by an attenuated strain *Salmonella typhimurium*, potentiates salmonella infection, and inhibits macrophage and polymorphonuclear leukocyte influx into the spleen. *Infect Immun*, 1999 ; 67 (2) : 891-8.

43. Kapoor LD. CRC handbook of ayurvedic medical plant. Boca Rato: CRC Press, 1990.
44. Roiss IA. Medical plant of the world : chemical constituents, traditional, and modern medical uses. Totowa, N.J. Human Press, 1999 xi, 415.
45. Murray MT, Pizzorno JE. An encyclopedia of natural medicine. Rocklin, CA: Prima Publishing, 1991.
46. *Aloe vera* Available from : URL : [http://www.yourskin.co.uk/plant-remedies/aloe-vera.htm#The healing properties of Aloe Vera](http://www.yourskin.co.uk/plant-remedies/aloe-vera.htm#The%20healing%20properties%20of%20Aloe%20Vera)
47. *Aloe vera* is a complete and intricately structured plant. Available from : URL : http://www.herbalanswers.com/ha_pages/aloevera.htm/
48. *Aloe vera* component. Available from : URL : <http://www.1st-aloe-vera-.com/aloe-vera-component.htm>
49. Afzal M, Ali M. Identification of some prostanoids in *Aloe vera* extracts. *Planta medica*, 1991 ; 57 : 38-40.
50. Peng SY, Norman J, Curtin G, Corrier D, McDaniel HR, Busbee D. Decreased mortality of norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. *Mol Biother*, 1991 ; 3 : 79-8.
51. Ramamoorthy L, Kemp MC, Tizard IR. Acemannan, a beta-(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. *Mol Pharmacol*, 1999 ; 50 : 878-84.
52. Yagi A, Harada N, Yamada H, Iwadore SI. Antibrandykinin active material in *Aloe saponaria*. *J Phaemaceut Sci*, 1982 ; 71 : 1172-74.
53. Schilcher H. Phytotherapy in paediatrics: Handbook for physicians and pharmacists : with reference to commission E monographs and 15 ESCOP monographs. Stuttgart : Medpharm Scientific Publishers, 1997 : 181.
54. Egger SF, Brown GS, Kelsey LS, Yates KM, Rosenberg LJ, Talmadge JE. Hematopoietic augmentation by a beta-(1,4)-linked mannan. *Cancer Immunol Immunother*, 1996 ; 43 : 195-205.
55. Egger SF, Brown GS, Kelsey LS, Yates KM, Rosenberg LJ, Talmadge JE. Studies on optimal dose and administration schedule of a hematopoietic

- stimulatory beta-(1,4)-linked mannan. *Int J Immunopharmacol* 1996 ; 18:113-26.
56. Davis RH, Leitner MG, Russo JM. Topical anti-inflammatory activity of *Aloe vera* as measured by ear swelling. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1987 ; 77:610-2.
 57. Davis RH, Rosenthal KY, Cesario RL, Rouw GA. Processed *Aloe vera* administered topically inhibits inflammation. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1989 ; 79 : 395-7.
 58. Davis RH, Leitner MG, Russo JM. Anti-inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1989 ; 79 : 263-76.
 59. Davis RH, Stewart GJ, Bregman PJ. *Aloe vera* and the inflamed synovial pouch model. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1992 ; 82 : 140-8.
 60. Hutter J, Salman M, Stavinoha W, et al. Anti-inflammatory c-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *J of Natural Product*, 1996 ; 59 : 541-43.
 61. Ro J, Lee B, Chung M, et al. The inhibitory mechanism of aloe glycoprotein (NY 945) on the mediator release in the guinea pig lung mast cell activated with antigen-antibody complexes. *Korean J Physiol Pharmacol*, 1998 ; 2 : 119-31.
 62. Yamamoto M, Sugiyama K, Maeda Y. Inhibitory effect of aloe extract on antigen and compound 48/80 induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1993 ; 39 : 395-4.
 63. McDaniel H, Combs C, Carpenter R, Kemp M, McAnalley B. An increase in circulating monocyte/macrophages (M/M) is induced by oral acemannan in HIV-1 patients. *Am J Clin Pathol*, 1990 ; 94 : 516-7.
 64. Kawai K, Beppu H, Shimpo K, et al. In vivo effect of *Aloe arborescens* Miller var. natalensis Berger on experimental *Tinea pedis* in guinea pig feet. *Phytotherapy Research*, 1998 ; 12 : 178-82.
 65. Shida T. Effect of aloe extract on peripheral phagocytosis in adult bronchial asthma. *Planta medica*, 1985 ; 51: 273-5.

66. Ishii Y, Tanizawa H, Takino Y. Studies of aloe. III. Mechanism of cathartic effect (2). *Chem Pharm Bull*, 1990 ; 38 : 197-200
67. Honig J, Geck P, Rauwald H. Inhibition of Cl-channels as a possible base of laxative action of certain anthraquinones and anthrones. *Planta medica*, 1992 ; 58 : 586-7.
68. Yagi T. The Synergistic purgative action of aloe-emodin anthrone and rhein anthrone in mice: synergism in large intestinal propulsion and water secretion. *J Pharm Pharmacol*, 1997 ; 49 : 22-25.
69. Bisset NG. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Stuttgart : MedPharm CRC Press, 1994 ; 566.
70. Blumenthal M. The complete German commission E monograph : therapeutic guide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council, 1998.
71. Parma N. Evaluation of *Aloe vera* leaf exudate and gel for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *Fitoterapy*, 1986 ; 57.
72. Survitayat W, Bunyapraphatsara N, Thirawarapan S, Watanabe K. Gastric acid secretion in inhibitory and gastric lesion protective effects of aloe preparation. *Thai Journal of Phytopharmacy*, 1997 ; 4 : 1-11.
73. Maze G, Terpolilli R, Lee M. *Aloe vera* extract prevent aspirin-induced gastric mucosal injury in rats. *Medical Science Research*, 1997 ; 25 : 765-66.
74. Teradaira R, Singzato M, Beppu H, Fujita K. Antigastric ulcer effect in rats of *Aloe arborescens* Miller var *natalensis* Berger. *Phytotherapy Research*, 1993;7.
75. Blitz J, Smith J, Gerard J. *Aloe vera* gel in peptic ulcer therapy : preliminary report. *J American Osteopathic Association*, 1963 ; 62 : 731-35.
76. Robinson M. Optimizing therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 1997 ; 92 : 12-17.
77. Robinson M. Medical therapy of inflammatory bowel disease for the 21st century. *Eur J Surg Suppl*, 1998 ; 582 : 90-8.

78. Ajabnoor M. Effect of aloes on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *J Ethnopharmacology*, 1990 ; 28 : 215-20.
79. Ghannam N. The Antidiabetic activity of aloes: preliminary clinical and experimental observations. *HormoneRes*, 1986; 24 : 288-94.
80. Beppu H, Nagamura Y, Fujita K. Hypoglycemic and antidiabetic effects in mice of *Aloe arborescens* Miller var.natalensis Berger. *Phytotherapy Research*, 1993 ; 7 : S37-S42.
81. Yongchaiyudha S, Rungpitarangsi V, Bunyapraphatsara N, Chokechajaroenporn O. Antidiabetic activity of *Aloe vera* L juice I. Clinical trial in new cases of diabetes melitus. *Phytomed*, 1996 ; 3 : 241-3.
82. Lorenzetti L, Salisbury R, Beal J, Baldwin J. Bacteriostatic property of *Aloe vera*. *J Pharmacol Sci*, 1964 ; 53 : 1287.
83. Montaner JS, Gill J, Singer J, et al. Double-blind placebo-controlled pilot trial of acemannan in advanced human immunodeficiency virus disease. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996 ; 12 : 153-7.
84. Singer J, Gill J, Arseneau R, McLean B. A randomized, placebo-controlled pilot trial of oral acemannan as an adjunctive to antiretroviral therapy in advanced disease. *Int Conf AIDS*, 1993 ; 9 : 494.
85. Syed T, Afzal M, Ashfax A, Holt A, Ali A, Ahmad S. Management of genital herpes in men with 0,5% *Aloe vera* extract in a hydrophilic cream : a Placebo-controlled double blind study. *Journal of Dermatological Treatment*, 1997 ; 8 : 99-102.
86. Grimaudo S, Tolomeo M, Gancitano R, D'Alessandro N, Aiello E. Effect of highly purified anthraquinoid compounds from *Aloe vera* on sensitive and multidrug resistant leukemia cells. *Oncology Report*, 1997 ; 4 : 341-43.
87. Corsi MM, Bertelli AA, Gaja G, Fulgenzi A, Ferrero ME. The therapeutic potential of *Aloe vera* in tumor-bearing rats. *Int J Tissue React*, 1998 ; 20 : 115-8.
88. Harris C, Pierce K, King G, yates KM, Hall J, Tizard I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasm. *J Biother*, 1991 ; 3 : 207-13.

89. Sheets MA, Unger BA, Giggelman GF, Tizard IR. Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Mol Biother*, 1991 ; 3 : 41-4.
90. King GK, Yates KM, Greenlee PG, et al. The Effect of acemannan immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc*, 1995 : 31 : 439-47.
91. Yates KM, Rosenberg LJ, Harris CK, et al. Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 1992 ; 35 : 177-89.
92. Desai KN, Wei H, Lamartiniere CA. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, roidex, on tumor promotion and regression. *Cancer Lett*, 1996 ; 101 : 93-6.
93. Parslow TG. *The Immune Response*. In: Medical immunology, 9th ed. New Jersey : Prentice Hall Int.Inc, 1997 ; 63-72.
94. Laurence DR, Bacharach AL. Petunjuk praktikum toksikologi. Dalam : Donatus IA, Suhardjono D, Nurlaela, Sugiyanto, Hakim L, Wahyono D, Mulyono. Yogyakarta : Fakultas Farmasi UGM, 1992.
95. Normal dosage for animals. Available from : URL : <http://www.natural-living.co.uk/howtouse/howtouse.html>
96. Supargiyono. *Mononuclear Phagocyte System (MPs)*. Makalah pada : kuliah defisiensi biologi molekuler dan imunologi. Yogyakarta : Tim Pengelola Program Doktor FK UGM, 29 Januari-18 Maret 2000 ; 1-9.
97. Dieterd RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Yen-jen Sung. *Production of reactive nitrogen intermediates by macrophages*. In: Burleson GR, Dean JH, Munson AE. *Methods in immunotoxicology*, vol 2. New York-Singapore : A John Willey and Sons S.Inc, 1995 ; 99-117.
98. Coligan JE, Krusbeek AM, Margulies DH, et.al. *Current protocol in immunology*, Vol.2 . New York – Singapore : A John Willey & Sons, Inc, 2000 ; 14.6.3.
99. Santoso S. *SPSS Versi 10 Mengolah data statistik secara profesional*. Cetakan Ke-3. Jakarta. PT.Elex Media Komputindo, 2002.