



**Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*)
terhadap Produksi NO Makrofag Mencit Balb/c yang Diinfeksi
*Salmonella typhimurium***

LAPORAN AKHIR PENELITIAN KARYA TULIS ILMIAH

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh
Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran

Disusun Oleh:

Ariestya Indah Permata Sari

G2A 005 024

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO**

SEMARANG

2009

HALAMAN PENGESAHAN

Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap
Produksi NO Makrofag Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella*
*typhimurium***

yang disusun oleh

Ariestya Indah Permata Sari

NIM : G2A 005 024

telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang pada tanggal
25 Agustus 2009 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan.

Tim Penguji

Ketua Penguji,

Penguji,

dr. Hermina Sukmaningtyas, M.Kes, Sp. Rad
NIP. 132 205 006

dr. Henny Kartikawati, M.Kes, Sp. THT-KL
NIP. 132 233 169

Pembimbing,

dr. Ratna Damma Purnawati, M.Kes
NIP. 131 916 037

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
ABSTRAK.....	viii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. <i>Nigella sativa</i> (Jintan Hitam).....	5
2.2. Respon Imun Terhadap Infeksi Mikroorganisme Intraseluler.....	9
2.3. Salmonellosis.....	15
BAB 3 KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	16
3.1. Kerangka Teori.....	16
3.2. Kerangka Konsep.....	17

3.3. Hipotesis.....	17
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	18
4.1. Ruang Lingkup Penelitian.....	18
4.2. Jenis Penelitian.....	18
4.3. Populasi dan Sampel.....	19
4.4. Variabel Penelitian.....	20
4.5. Cara Pengumpulan Data.....	20
4.6. Prosedur Penelitian.....	21
4.7. Definisi Operasional.....	23
4.8. Analisis Data	24
4.9. Alur Penelitian	25
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	26
BAB 6 PEMBAHASAN.....	29
BAB 7 KESIMPULAN.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi kimia dari struktur <i>volatile oil</i> (minyak atsiri) <i>Nigella sativa</i>	7
Tabel 2. Komposisi asam lemak yang terkandung dalam <i>fixed oil</i> dari <i>Nigella sativa</i>	8
Tabel 3. Rerata kadar NO makrofag pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (μM).....	26
Tabel 4. Nilai p dari uji <i>Mann-Whitney</i>	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Grafik <i>box-plot</i> dari rerata kadar NO makrofag pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.....	27
Gambar 2. Jalur transduksi sinyal yang menyebabkan peningkatan ekspresi iNOS.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alokasi waktu penelitian

Lampiran 2. Cara perhitungan dosis

Lampiran 3. Prosedur pembuatan ekstrak minyak biji *Nigella sativa*

Lampiran 4. Prosedur isolasi makrofag mencit

Lampiran 5. Prosedur pemeriksaan produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag mencit

Lampiran 6. Tabel rerata produksi NO makrofag

Lampiran 7. Hasil analisis data

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*)
terhadap Produksi NO Makrofag Mencit Balb/c yang Diinfeksi
*Salmonella typhimurium***

Ariestya Indah Permata Sari¹, Ratna Damma Purnawati²

ABSTRAK

Latar Belakang: Makrofag yang teraktivasi pada infeksi mikroorganisme intraseluler dapat meningkatkan produksi *nitric oxide* (NO). *Nigella sativa* (jintan hitam) dilaporkan memiliki efek imunomodulator dalam meningkatkan produksi sitokin yang mempengaruhi aktivasi makrofag. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* terhadap produksi NO makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metode: Penelitian eksperimental dengan *post test only control group design* ini menggunakan 36 mencit Balb/c sebagai sampel penelitian. Setelah diadaptasikan selama seminggu, mencit dibagi secara acak ke dalam enam kelompok: K(-) hanya diberi pakan standar dan pelarut PEG (*polyethyleneglycol*); K(+)*ST* (*Salmonella*) diberi PEG dan diinokulasi *Salmonella typhimurium*; K(+)*NS* (*Nigella sativa*) diberi ekstrak *Nigella sativa* (dilarutkan dalam PEG) dosis 5,2 mg/hari; serta P1, P2, dan P3 diberi ekstrak *Nigella sativa* dosis 0,52 mg/hari, 5,2 mg/hari, dan 52 mg/hari selama 15 hari dan diinokulasi *Salmonella typhimurium* pada hari ke-11. Pada hari ke-16 semua mencit didekapitasi kemudian makrofag diisolasi dari cairan peritoneum. Produksi NO diperiksa dari hasil kultur makrofag dengan menggunakan *ELISA reader*. Data yang didapat diuji normalitasnya dengan *Saphiro Wilk test* kemudian dianalisa dengan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji beda *Mann Whitney*.

Hasil: Produksi NO makrofag mencit kelompok kontrol K(+)*NS* dan kelompok perlakuan P2 merupakan yang paling tinggi di antara semua kelompok, sedangkan produksi NO paling rendah ditunjukkan oleh kelompok perlakuan P1 dan P3. Perbedaan bermakna terdapat pada produksi NO makrofag mencit antar semua kelompok kecuali antara kelompok perlakuan P1 dengan P3 ($p=0,146$).

Kesimpulan: Ekstrak *Nigella sativa* dosis 5,2 mg/hari dapat meningkatkan produksi NO makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Kata kunci: Ekstrak *Nigella sativa*, *Nitric oxide* (NO) makrofag, sistem imun seluler.

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

² Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

***The Effect of Jintan Hitam (Nigella sativa) Extract
on Macrophages' NO Production of Balb/c Mice which Infected by
Salmonella typhimurium***

Ariestya Indah Permata Sari¹, Ratna Damma Purnawati²

ABSTRACT

Backgrounds: Activated macrophages in intracellular microorganisms infection can increase nitric oxide (NO) production. *Nigella sativa* (jintan hitam) was reported to have immunomodulator effect in increasing cytokines production which influence macrophages' activation. The aim of the research was to identify the effect of *Nigella sativa* extract on macrophages' NO production of Balb/c mice which infected by *Salmonella typhimurium*.

Methods: This experimental research whose design was Post Test-Only Control Group Design, used 36 Balb/c mice as the samples. All mice were adapted during one week, then they were divided randomly into 6 groups: K(-) was treated by standar food and PEG (polyethileneglycol); K(+)*ST* (*Salmonella*) was treated by standar food and infected by *Salmonella typhimurium*; K(+)*NS* (*Nigella sativa*) was treated by *Nigella sativa* extract (soluted in PEG) 5,2 mg/day; also P1, P2, and P3 were treated by *Nigella sativa* extract 0,52 mg/day, 5,2 mg/day, and 52 mg/day during 15 days and inoculated by *Salmonella typhimurium* on day 11. All mice were terminated and their macrophages were isolated from peritoneal fluid on day 16. NO production was examined from culture of macrophages by using ELISA reader. The normality of data was tested by Saphiro Wilk test, then analyzed by Kruskal Wallis test and continued with Mann Whitney test.

Results: NO production of mice macrophages in K(+)*NS* control group and P2 treatment group were the highest of all, while the lowet were showed by P1 and P3 groups. Significant differences of macrophages' NO production were appeared among all group except between P1 group with P3 group ($p=0,146$).

Conclusion: *Nigella sativa* extract dose 5,2mg/day could increase macrophages' NO production of Balb/c mice which infected by *Salmonella typhimurium*.

Keywords: *Nigella sativa* extract, macrophages' nitric oxide (NO), cell mediated immunity.

¹Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang

²Histology Department, Faculty of Medicine Diponegoro University, Semarang

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Berbagai penelitian terhadap obat tradisional saat ini banyak dilakukan untuk mencari efek yang bermanfaat bagi sistem imun tubuh, salah satu di antaranya adalah *Nigella sativa*. *Nigella sativa* atau yang dikenal sebagai jintan hitam telah lama digunakan untuk meningkatkan kesehatan dan melawan penyakit.¹ Kandungan kimia *Nigella sativa* terdiri atas asam amino, protein, karbohidrat, minyak atsiri, alkaloid, saponin, dan berbagai kandungan lain. Kandungan utama dari minyak *Nigella sativa* yang telah diketahui memiliki peran secara farmakologi adalah *thymoquinone*.²⁻⁴

El-Kadi and Kandil membuktikan bahwa *Nigella sativa* dapat meningkatkan populasi sel T-helper serta rasio sel T-helper terhadap sel T-suppressor yang rendah.^{3,5} Pada penelitian lain minyak *Nigella sativa* ternyata dapat menurunkan *viral load* di hati dan limpa disertai peningkatan pada IFN- γ makrofag, dan sel T CD4⁺.^{3,6} *Nigella sativa* juga dilaporkan dapat meningkatkan produksi IL-3 dan IL-1 β .^{3,7} Penelitian yang dilakukan oleh El-Mahmoudy et al melaporkan bahwa *thymoquinone* yang merupakan zat aktif *Nigella sativa* dapat menurunkan kenaikan *nitric oxide* (NO) tikus yang diinduksi oleh *streptozotocin* selama tiga puluh hari.⁸ Berbagai penelitian yang telah membuktikan efek *Nigella sativa* dalam menstimulasi sitokin

MAF mengindikasikan potensi *Nigella sativa* dalam meningkatkan fungsi makrofag yang berperan dalam sistem imun seluler.³

Mekanisme pertahanan tubuh terdiri dari imunitas bawaan dan imunitas adaptif.⁹⁻¹¹ Imunitas bawaan maupun imunitas adaptif dibagi lagi menjadi respon imun humoral dan respon imun seluler.^{9,11} Dalam melawan mikroorganisme intraseluler seperti Salmonella, respon imun yang terjadi adalah respon imun seluler. Salah satu ciri mikroorganisme intraseluler adalah kemampuannya untuk dapat hidup bahkan berkembangbiak dalam fagosit.^{9,10} Dalam sistem imun seluler, sel T yang terstimulasi oleh antigen akan mengaktifasi makrofag untuk menghancurkan mikroorganisme yang difagosit.⁹ Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efekturnya hanya setelah sel itu diaktivasi oleh *macrophage activating factors* (MAF).¹⁰ Aktivasi tersebut dapat mengkonversi oksigen molekul menjadi *reactive oxygen intermediate* (ROI) dan memproduksi *Nitric Oxide* (NO) yang berperan penting sebagai mediator sitotoksik terhadap sel tumor dan mikroorganisme intraseluler.⁹ NO yang diproduksi oleh makrofag merupakan hasil sintesis dari *L-arginine* melalui kerja enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS).^{9,12,13} iNOS dapat timbul sebagai respon terhadap lipopolisakarida (LPS) dan antigen, terutama dalam bentuk kombinasi dengan IFN- γ .^{9,14} Selain itu, ekspresi iNOS juga dipicu oleh sitokin inflamasi seperti IL-1 β dan TNF- α .^{15,16}

1.2. Perumusan Masalah

Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* terhadap produksi NO makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* terhadap produksi NO makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini antara lain:

- 1) Membandingkan produksi NO makrofag mencit Balb/c antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.
- 2) Menentukan dosis optimal ekstrak *Nigella sativa* dalam meningkatkan produksi NO makrofag mencit Balb/c di antara kelompok perlakuan.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, antara lain:

- 1) Menambah informasi mengenai salah satu pengaruh ekstrak minyak *Nigella sativa* sebagai imunomodulator terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*.
- 2) Sebagai dasar teori bagi penelitian selanjutnya mengenai manfaat ekstrak *Nigella sativa*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Nigella sativa* (Jintan Hitam)

2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi

Biji *Nigella sativa* L. (termasuk ke dalam *family* Ranunculaceae), yang secara umum dikenal sebagai “*black seed*” atau “*black cumin*”, telah digunakan selama ribuan tahun sebagai bumbu dan pengawet makanan.¹⁷ Di Asia Selatan, *Nigella sativa* disebut sebagai *kalonji*, dan di Arab dinamakan *habbatus sauda*.¹ Tanaman *Nigella sativa* secara keseluruhan tampak seperti segitiga, bijinya berwarna hitam, beraroma sangat menyengat dan rasanya pahit. *Nigella sativa* adalah tumbuhan biseksual yang artinya dapat mengembangbiakkan dirinya sendiri dengan membentuk kapsul buah yang mengandung biji. Saat kapsul buah matang dan membuka, biji yang ada di dalamnya akan mengudara dan berubah menjadi hitam sehingga disebut Biji Hitam (*Black Seed*).^{3,18}

2.1.2. Penggunaan Sebagai Obat Tradisional

Nigella sativa digunakan secara luas sebagai obat alami, bumbu, pengawet, dan aromatis. Secara tradisional, *Nigella sativa* telah digunakan sebagai diuretik, obat diare, dispepsia, obat pemacu menstruasi, dan pelancar ASI.¹ Biji tanaman ini secara tradisional telah digunakan selama berabad-abad di Timur Tengah, Afrika Utara, dan India, untuk mengobati asma, batuk, influenza, eksim, dan obat cacing.² Pada berbagai kombinasi, *Nigella sativa*

telah digunakan untuk obesitas dan dispneu. Biji tanaman ini juga bermanfaat untuk nyeri kepala kronik dan migrain, keracunan merkuri, luka, serta lepra.¹ Saat ini, *Nigella sativa* telah dilaporkan memiliki banyak efek farmakologi termasuk anti parasit (anti helmintik, anti cestoda dan anti schistosoma), anti bakteri, anti fungi, antivirus, anti oksidan, anti inflamasi dan telah menunjukkan aktivitas dalam meningkatkan respon imunitas berperantara sel T.^{1,4}

2.1.3. Kandungan Kimia

Kandungan kimia *Nigella sativa* bermacam-macam dan terdiri atas asam amino, protein, karbohidrat, minyak *fixed* dan *volatile*, alkaloid, saponin, dan banyak kandungan lain.²⁻⁴ Minyak *Nigella sativa* memiliki kandungan zat aktif *thymoquinone* (TQ), *dithymoquinone* (DTQ), *thymohydroquinone* (THQ), dan *thymol* (THY). Uji saring *Thin Layer Chromatography* (TLC) dari sampel minyak menunjukkan keberadaan empat komponen utama: thymoquinone, carvacrol, tanethole, dan 4-terpinol. Thymoquinone adalah zat aktif utama dari *volatile oil* (minyak atsiri) *Nigella sativa*.^{3,4} Sebagian besar aktivitas farmakologis *Nigella sativa* dikaitkan dengan keberadaan thymoquinone.¹ Komposisi minyak *fixed* dan *volatile* dari *Nigella sativa* dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2.

Tabel 1. Komposisi kimia dari struktur *volatile oil* (minyak atsiri) *Nigella sativa*¹⁹

Senyawa Kimia	Persentase
<i>n</i> -Nonane	1,7
3-Methyl nonane	0,3
1,3,5-Trimethyl benzene	0,5
<i>n</i> -Decane	0,4
1-Methyl-3-propil benzene	0,5
1-Ethyl-2,3-dimethyl benzene	0,2
<i>n</i> -Tetradecane	0,2
<i>n</i> -Hexadecane	0,2
<i>Nonterpenoid hydrocarbon</i>	4,0
α-Thujene	2,4
β-Pinene	1,2
Sabinene	1,4
γ-Pinene	1,3
Myrcene	0,4
δ-Phellandrene	0,6
<i>p</i> -Cymene	14,8
Limonene	4,3
Terpinene	0,5
<i>Monoterpenoid hydrocarbon</i>	26,9
Fenchone	1,1
Dihydrocarvone	0,3
Carvone	4,0
Thymoquinone	0,6
<i>Monoterpenoid keton</i>	6,0
Terpinen-4-ol	0,7
<i>p</i> -Cymene-8-ol	0,4
Carvacrol	1,6
<i>Monoterpenoid alcohols</i>	2,7
Longipinene	0,3
Longifolene	0,7
<i>Sesquiterpenoid hydrocarbon</i>	1,0
Estragole	1,9
Anisaldehyde	1,7
<i>Trans</i> -Anethole	38,3
Myristicin	1,4
Dill apiole	1,8
Apiole	1,0
<i>Phenyl propanoid compounds</i>	46,1
Total senyawa kimia	86,7

Tabel 2. Komposisi asam lemak yang terkandung dalam *fixed oil* dari *Nigella sativa*¹⁹

Asam Lemak	Persentase
Asam laurat	0,6
Asam Myristik	0,5
Asam palmitat	12,5
Asam stearat	3,4
Asam oleat	23,4
Asam linoleat	55,6
Asam linolenat	0,4
Asam eikosadienoat	3,1
Total asam lemak	99,5

2.1.4. Potensi *Nigella sativa* Sebagai Imunomodulator

Salah satu khasiat berharga *Nigella sativa* adalah efek imunomodulator dari zat-zat yang dikandungnya.³ El-Kadi and Kandil melakukan penelitian tentang efek *Nigella sativa* terhadap sistem imun tubuh manusia. *Nigella sativa* yang diberikan pada sukarelawan dengan rasio sel T-*helper* dan sel T-*suppressor* yang rendah, ternyata dapat meningkatkan populasi sel T-*helper* dan rasio sel T-*helper* terhadap sel T-*suppressor* tersebut. Penelitian tersebut melaporkan bahwa pemberian minyak *Nigella sativa* selama empat minggu menunjukkan 55% peningkatan rasio sel T CD4 terhadap CD8 dan 30% peningkatan fungsi sel NK.^{3,5} Dalam sebuah penelitian yang menggunakan *murine Cytomegalovirus* sebagai model, minyak *Nigella sativa* yang diinjeksikan secara intraperitoneal dapat menurunkan *viral load* di hati dan limpa disertai peningkatan pada IFN- γ makrofag, dan sel T CD4⁺.^{3,6} IFN- γ merupakan sitokin utama yang dapat mengaktifasi makrofag.^{9,10}

Nigella sativa juga dilaporkan dapat meningkatkan produksi IL-3 yang dihasilkan oleh limfosit manusia dan IL-1β yang memiliki efek pada makrofag.^{3,7} IL-3 dapat bertindak sebagai MAF sehingga meningkatkan makrofag yang teraktivasi.²⁰ Lebih jauh lagi, penelitian yang dilakukan oleh Farah et al. melaporkan bahwa pemberian minyak *Nigella sativa* secara oral selama enam minggu pada *hamster* yang diinduksi streptozotocin, memberikan efek yang bermanfaat secara signifikan yang dapat dilihat melalui peningkatan aktivitas fagositik makrofag peritoneal dan hitung limfosit darah tepi.³ Penelitian yang dilakukan oleh El-Mahmoudy et al. melaporkan bahwa *thymoquinone* yang merupakan zat aktif *Nigella sativa* dapat menurunkan kenaikan *nitric oxide* (NO) tikus yang diinduksi oleh *streptozotocin* selama tiga puluh hari.⁸ Hal ini mengindikasikan potensi minyak *Nigella sativa* dalam meningkatkan fungsi sel imun non-spesifik, termasuk makrofag dan sel NK yang berperan sebagai imunitas seluler.³

2.2. Respon Imun Terhadap Infeksi Mikroorganisme Intraseluler

Pertahanan tubuh diperantarai oleh mekanisme efektor dari imunitas bawaan dan imunitas adaptif. Imunitas bawaan terdiri atas mekanisme pertahanan seluler dan biokimia yang telah terbentuk bahkan sebelum terjadi infeksi.⁹ Imunitas bawaan disebut juga dengan imunitas non-spesifik.^{9,12} Berkebalikan dengan imunitas bawaan, imunitas adaptif merupakan respon imun yang terstimulasi oleh masuknya agen infeksius dan beradaptasi terhadap infeksi tersebut. Imunitas adaptif memiliki kapasitas ekstra untuk

membedakan bermacam-macam mikroba dan molekul yang sangat mirip, sehingga disebut juga imunitas spesifik.⁹

2.2.1. Imunitas *Non-Spesifik* Terhadap Infeksi Mikroorganisme Intraseluler

Imunitas bawaan atau yang sering disebut imunitas *non-spesifik* adalah lini pertama dalam sistem pertahanan tubuh melawan infeksi.⁹ Imunitas ini dapat mengeliminasi bakteri dan mekanisme efekturnya sering digunakan pula dalam imunitas adaptif.^{9,10} Bila suatu patogen menembus kulit atau selaput lendir untuk pertama kali, maka tubuh akan mengerahkan semua komponen sistem imun *non-spesifik* untuk menghancurkannya.¹² Pola dan reaksi imunologik bergantung pada jenis dan sifat mikroorganisme yang menyerangnya.⁹ Dalam menghadapi mikroorganisme intraseluler, respon yang terjadi adalah respon imun seluler. Salah satu ciri mikroorganisme intraseluler adalah kemampuannya untuk dapat hidup bahkan berkembangbiak dalam fagosit.^{9,10}

Fagosit, diawali oleh neutrofil dan kemudian makrofag, memakan dan mencoba menghancurkan mikroorganisme ini, tetapi mikroorganisme ini resisten terhadap degradasi oleh fagosit.⁹ Makrofag berasal dari sel monosit yang bermigrasi dari peredaran darah ke tempat tujuan di berbagai jaringan yang kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag.^{9,12} Sel ini dapat ditemukan pada semua organ dan diberi nama khusus berdasarkan lokasinya.⁹ Makrofag peritoneal yang bebas akan berada dalam rongga peritoneum.¹² Pada dasarnya, makrofag terlibat dalam semua stadium respon imun.¹⁰ Jika sel

makrofag dalam respon imun alami dianggap sebagai sel efektor, maka dalam respon imun adaptif sel makrofag bertindak sebagai sel penyaji (*antigen presenting cell* atau APC).¹¹ Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efekturnya hanya setelah sel itu diaktivasi oleh bakteri, sitokin, dan stimulus lain yang disebut sebagai *macrophage activating factors* (MAF).¹⁰

Mikroorganisme intraselular mengaktifkan sel-sel NK baik secara langsung maupun melalui stimulasi makrofag yang menghasilkan IL-12, sitokin kuat pengaktif sel NK. Kemudian sel NK memproduksi IFN- γ yang kembali mengaktifkan makrofag dan meningkatkan pemusnahan bakteri yang difagosit.^{9,10} Selain IFN- γ , VIL-3 juga dapat bertindak sebagai *macrophage activating factor* (MAF).²⁰ Makrofag yang teraktivasi akan meningkatkan jumlah granula lisosom, lebih banyak mitokondria dan kapasitas yang lebih besar untuk memfagosit partikel yang tersaji.²¹ Penggabungan vakuola fagositik (fagosom) dengan lisosom menghasilkan fagolisosom, tempat di mana mekanisme pembunuhan mikroba dikonsentrasikan. Makrofag yang teraktivasi membunuh mikroba yang difagosit dengan memproduksi molekul pembunuh mikroba dalam fagolisosom. Aktivasi tersebut mengkonversi oksigen molekuler menjadi *reactive oxygen intermediate* (ROI) yang merupakan agen oksidasi reaktif tinggi penghancur mikroba. Selain ROI, makrofag juga memproduksi *reactive nitrogen intermediate* (RNI) terutama *nitric oxide* (NO).⁹

2.2.2. Imunitas Spesifik Terhadap Infeksi Mikroorganisme Intraseluler

Imunitas *non*-spesifik dapat membatasi pertumbuhan bakteri selama beberapa waktu tetapi biasanya gagal mengeradikasi infeksi ini tanpa *cell-mediated immunity* (CMI) dari imunitas adaptif. CMI adalah fungsi efektor dari limfosit T yang menyajikan mekanisme pertahanan melawan mikroba yang bertahan hidup dalam makrofag atau menginfeksi sel *non*-fagosit. Limfosit T mengenali antigen protein dari mikroba intraseluler yang disajikan pada permukaan sel yang terinfeksi sebagai ikatan peptida pada molekul *major histocompatibility complex* (MHC) sendiri.⁹ Dalam melawan bakteri intraseluler ada 2 jenis reaksi yang terjadi, yaitu: 1) pembunuhan bakteri intraseluler yang difagositosis oleh makrofag teraktivasi; 2) lisis sel yang terinfeksi oleh sel T CD8⁺. Sementara makrofag merupakan eksekutor *non*-spesifik, sel T merupakan mediator spesifik untuk menghancurkan mikroba intraseluler.^{9,10} Selain melalui IFN- γ yang dihasilkan oleh sel NK, makrofag juga teraktivasi oleh IFN- γ yang dihasilkan oleh sel T.¹⁰ Aktivasi ini kemudian juga menghasilkan produksi fragmen protein yang dapat berasosiasi secara efektif dengan MHC kelas I dan II.¹³

Protein bakteri intraseluler dapat merangsang sel T CD4⁺ (melalui kompleks antigen-MHC kelas II) maupun CD8⁺ (melalui kompleks antigen-MHC kelas I).^{9,10} Sel T CD4⁺ berdiferensiasi menjadi efektor Th1 di bawah pengaruh IL-12 yang diproduksi oleh makrofag dan sel dendritik.⁹ Ketika efektor sel Th1 dan sel T CD8⁺ terstimulasi oleh antigen, sel-sel tersebut mensekresi sitokin, terutama IFN- γ dan mengekspresikan CD40L. IFN- γ

merupakan sitokin utama yang mengaktifkan makrofag. Aktivasi itu berfungsi bersama LPS bakteri atau sinyal CD40 untuk mengeluarkan respon lain. CD40L berikatan dengan CD40 pada makrofag yang menyajikan antigen kepada sel T dan mengaktifkan jalannya transduksi sinyal intraselular yang mirip dengan sinyal yang diaktifkan oleh reseptor TNF. Sebagai respon terhadap sinyal CD40 dan IFN- γ , produksi beberapa protein dalam makrofag mengalami peningkatan, meningkatkan sintesis ROI dan NO yang merupakan agen mikrobisidal poten dan membunuh mikroba yang telah ditelan. Aktivasi makrofag juga meningkatkan jumlah enzim lisosom yang dapat menghancurkan mikroba yang difagosit setelah terjadinya fusi fagosom dengan lisosom.^{9,10}

Bakteri intraselular yang ditemukan di luar fagosom, dan yang berada dalam sel *non*-fagosit, tidak bisa dieliminasi oleh aktivasi fagosit yang diperantarai sel T. Jalan satu-satunya yang dapat dilakukan untuk mengeradikasi infeksi tersebut adalah dengan membunuh sel yang terinfeksi, dan peran ini dilakukan oleh *cytotoxic T lymphocyte* (CTL). CTL berikatan dengan sel target dengan menggunakan reseptor antigen dan molekul ekstra seperti CD8 dan integrin LFA-1. Agar dikenali secara efisien oleh CTL, sel target harus mengekspresikan kompleks molekul MHC kelas I pada sebuah peptida dan *intracellular adhesion molecule-1* (iCAM-1, ligan utama untuk LFA-1). Dalam beberapa menit setelah CTL mengenali targetnya, sel target tersebut mengalami perubahan yang menyebabkannya mati melalui apoptosis.⁹

2.2.3. Nitric Oxide

Nitric oxide merupakan molekul gas anorganik.¹⁵ NO bersifat reaktif tinggi yang memperantarai efek sitotoksik pada mikroorganisme dan sel tumor. NO memiliki peranan yang penting sebagai mediator sitotoksik makrofag melawan patogen intraseluler.²¹ NO dapat berdifusi dengan bebas ke dalam dan ke luar sel maupun jaringan.¹⁵ NO yang diproduksi oleh makrofag, merupakan hasil sintesis dari *L-arginine* oleh enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS).^{9,12,13} iNOS dapat timbul sebagai respon terhadap lipopolisakarida (LPS) dan antigen atau produk mikroba lainnya yang mengaktifkan *toll like receptor* (TLR), terutama dalam bentuk kombinasi dengan IFN- γ .^{9,14} Selain itu, ekspresi iNOS juga dipicu oleh sitokin inflamasi seperti IL-1 β dan TNF- α .^{16,21} iNOS mengkatalisasi konversi *arginine* menjadi *citrulline*, sehingga gas NO dapat dikeluarkan dengan bebas.^{9,15} Dalam fagolisosom, NO dapat berkombinasi dengan hidrogen peroksida atau superoksida yang dihasilkan oleh oksidase fagosit, untuk membentuk radikal peroksinitrit reaktif tinggi yang dapat membunuh mikroorganisme intraseluler.^{9,14}

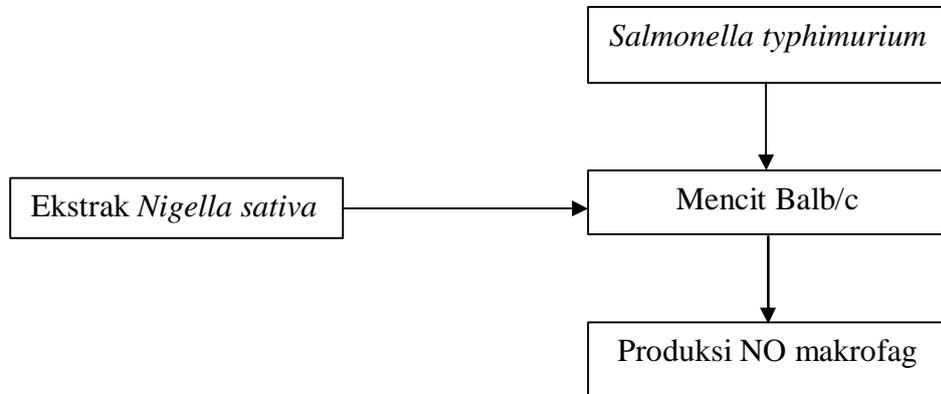
Bakteri intraseluler melawan pengasaman oleh fagosom dan berurutan menghindari fusi lisosom fagosom. Untuk berkompetisi memperebutkan cadangan besi intraseluler, beberapa patogen memiliki mekanisme tambahan besi yang poten. Sedangkan untuk menghindari pembunuhan bakteri oleh *reactive oxygen intermediates* (ROI) atau *reactive nitrogen intermediates* (RNI), beberapa bakteri menghasilkan enzim detoksifikasi.²¹

2.3. Salmonellosis

Salmonellosis adalah infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella* dengan manifestasi di antaranya adalah demam tifoid.²² Di Indonesia, demam tifoid masih merupakan penyakit endemik.²³ Berdasarkan profil kesehatan Indonesia tahun 2005, dari data 10 penyakit utama pasien rawat inap di rumah sakit, jumlah terbanyak adalah diare dan gastroenteritis oleh penyebab infeksi tertentu (infeksi kolitis) 7,52%, diikuti penyakit demam tifoid dan paratifoid 3,15%.²⁴ Demam tifoid berada di urutan ke enam sebagai penyebab kematian balita di Indonesia pada tahun 2006 (sebanyak 3,8%).²⁵ Sedangkan dalam daftar 10 penyakit utama pasien rawat inap di rumah sakit, demam tifoid berada di urutan ke tiga dengan insidensi sebanyak 3,26%.^{25,26}

Salmonella adalah kuman anaerob intraseluler fakultatif gram negatif.²⁷ *Salmonella enterica* adalah patogen gram negatif yang dapat menginfeksi berbagai tubuh mamalia. Pada manusia, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* merupakan penyebab umum penyakit keracunan makanan dan menyebabkan gastroenteritis. Sedangkan pada mencit, bakteri tersebut lebih banyak menyebabkan penyakit sistemik yang mirip demam tifoid.²⁸

3.2. Kerangka Konsep



3.3. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

1. Terdapat pengaruh ekstrak *Nigella sativa* terhadap peningkatan produksi NO makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.
2. Dapat diperoleh dosis optimal ekstrak *Nigella sativa* dalam meningkatkan produksi NO makrofag mencit Balb/c di antara kelompok perlakuan.