



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Syzygium polyanthum*  
TERHADAP PRODUKSI ROI MAKROFAG  
PADA MENCIT BALB/c YANG DIINOKULASI  
*Salmonella typhimurium***

**ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH**

Diajukan untuk melengkapi syarat  
Dalam menempuh  
Program Pendidikan Sarjana  
Fakultas Kedokteran

Oleh :

**NETY WULANDARI CHRISNANINGSIH  
G2A002120**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2006**

# LEMBAR PENGESAHAN

## ARTIKEL KARYA ILMIAH

### PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Syzygium polyanthum* TERHADAP PRODUKSI ROI MAKROFAG PADA MENCIT BALB/c YANG DIINOKULASI *Salmonella* *typhimurium*

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Nety Wulandari Chrisnaningsih

NIM G 2A 002 120

Telah dipertahankan didepan tim penguji KTI Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 25 Juli 2006, dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan.

#### TIM PENGUJI

Ketua Penguji  ( <u>dr. Andrew Johan, M.Si</u> ) NIP 131 673 427	
Penguji  ( <u>dr. Anindita Soetadji Sp.A</u> ) NIP 132 296 948	Pembimbing  ( <u>dr. YL Aryoko Widodo M. Kes</u> ) NIP 132 163 897

#### *The Effect of Syzygium polyanthum Extract Toward ROI Production of Balb/c Mice Macrophage Inoculated by Salmonella typhimurium*

Nety Wulandari C<sup>1)</sup>, Aryoko Widodo<sup>2)</sup>

#### ABSTRACT

**Background:** *The extract from Syzygium polyanthum contain many active substances such as essential oil (sitral and eugenol), tannin, flavonoid and metachavicolt The effect of these agents are antibacterial and immunomodulatory effects by enhancing the phagocytosis. In phagocytosis, activated phagocyte (macrophage and neutrophyl) will secrete ROI (Reactive Oxygen Intermediate). In this study to find out the effect of Syzygium*

*polyanthum extract can increase ROI production of Balb/c mice macrophage inoculated by Salmonella typhimurium.*

**Method:** *This was laboratorial experiment study using The Posttest only control group design. The samples were 20 male Balb/c mice and divided into 4 groups randomly. They were, K – (no treatment), K+(inoculated by Salmonella typhimurium), P1 (inoculated by Salmonella typhimurium and treated with Syzygium polyanthum extract 56,7mg/day), P2 (inoculated by Salmonella typhimurium and treated with green tea 390mg/day). In the first day they were infected by Salmonella typhimurium intraperitoneally in  $10^6$  doses, five day later mice killed. Macrophage isolated from peritoneal cavity and then ROI production examined with NBT (Nitro Blue Tetrazolium) reduction PMA(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)and without PMA)*

**Results:** *Seen that there is significant difference ( $p \leq 0,05$ ) on macrophage ROI production between K(-) and P1. But, there is no significant difference ( $p \geq 0,05$ ) between P1 and K(+), P1 and P2.*

**Conclusion:** *The extract from Syzygium polyanthum can't increase macrophage ROI production of Balb/c mice inoculated by Salmonella typhimurium.*

**Keywords:** *Syzygium polyanthum, ROI (Reactive Oxygen Intermediate), Salmonella typhimurium, macrophage.*

<sup>1)</sup> *Student of Medical Faculty of Diponegoro University Semarang*

<sup>2)</sup> *Lecturer in Department of Chemistry Medical Faculty of Diponegoro University Semarang*

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Syzygium polyanthum*  
TERHADAP PRODUKSI ROI MAKROFAG PADA MENCIT BALB/c  
YANG DIINOKULASI *Salmonella typhimurium***

Nety Wulandari C<sup>1)</sup>, Aryoko Widodo<sup>2)</sup>

**ABSTRAK**

**Latar belakang :** Ekstrak *syzygium polyanthum* memiliki zat aktif yaitu minyak atsiri ( sitral dan eugenol ), tannin, flavonoid, serta methachaficol yang dapat berperan sebagai antibakteri dan meningkatkan sistem imun tubuh diantaranya dengan meningkatkan proses fagositosis. Dalam proses fagositosis, fagosit (makrofag dan neutrofil) yang teraktifasi akan mensekresi ROI (*Reaktive oxygen intermediates*). Penelitian ini ingin membuktikan apakah ekstrak *Syzygium polyanthum* menyebabkan peningkatan produksi ROI makrofag dari mencit strain *Balb/c* yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* berbeda bila dibandingkan dengan kontrol.

**Metode:** Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dan menggunakan *The Posttest Only Control Group Design*. Sampelnya adalah 20 ekor mencit yang dipilih secara random. Seluruh sample dibagi menjadi 4 kelompok yaitu: K-(tanpa perlakuan), K+ (diinokulasi *Salmonella typhimurium*), P1(diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak *Syzygium polyanthum* 56,7 mg/hari).P2(diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan diberi teh hijau 390mg/hari). Pada hari pertama diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal dengan dosis  $10^6$ , lima hari kemudian mencit dibunuh dan diambil cairan peritonelnya untuk pemeriksaan produksi ROI dengan cara reduksi NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) dengan PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) dan non PMA.

**Hasil:** Terlihat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) pada produksi ROI makrofag kelompok P1 dengan K(-). Namun, terdapat perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) antara kelompok P1 dengan K (+) dan P1 dengan P2.

**Kesimpulan:** Ekstrak *Syzygium polyanthum* tidak dapat meningkatkan produksi ROI makrofag mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

**Kata Kunci:** *Syzygium polyanthum, ROI((Reactive oxygen intermediates), Salmonella typhimurium, makrofag.*

<sup>1)</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

<sup>2)</sup>Staf Pengajar Bagian Kimia Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

## PENDAHULUAN

Demam tifoid adalah penyakit sistemik akut akibat infeksi *Salmonella typhi*. Penyakit ini merupakan penyakit menular dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Pada studi epidemiologi disebutkan bahwa insidensi demam tifoid mencapai 70% - 80% pada usia 12 sampai 30 tahun, 10% - 20% pada usia 30 sampai 40 tahun.<sup>13</sup>

*Salmonella typhi* termasuk *Enterobacteriaceae* (kuman enterik batang gram negatif) dan bersifat anaerob fakultatif atau aerob, tak berspora, intraseluler fakultatif. *Salmonella typhi* dan *paratyphi* hanya patogen terhadap manusia, sedang *Salmonella typhimurium* hanya patogen terhadap tikus namun akan memberikan kelainan yang serupa dengan demam tifoid pada manusia. Oleh karena itu pada penelitian eksperimental infeksi demam tifoid yang dipakai adalah *Salmonella typhimurium*.<sup>4</sup>

Tingginya angka morbiditas dan mortalitas demam tifoid membuat berbagai pihak berupaya untuk menyelesaikan problem ini. Saat ini di Indonesia sedang berkembang paradigma baru dalam bidang kesehatan, yaitu penggunaan obat-obat tradisional. Salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional adalah daun salam yang mempunyai efek anti mikroba dan peningkatan respon imun.<sup>1</sup>

Daun salam yang memiliki nama latin *Syzygium polyanthum* mengandung senyawa antimikroba yaitu minyak atsiri (sitral dan eugenol), tannin, flavonoid serta metachavicol.<sup>3</sup> Fenol dalam minyak atsiri menyebabkan denaturasi protein pada dinding sel kuman dengan membentuk struktur tersier protein dengan ikatan nonspesifik atau ikatan disulfida. Sekuisterpenoid dalam minyak atsiri dapat merusak membran sel kuman oleh senyawa lipofilik. Sedang tanin menyebabkan denaturasi protein dengan membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan nonspesifik seperti ikatan hidrogen dan efek hidrofobik sebagaimana pembentukan ikatan kovalen, menginaktifkan adhesin kuman (molekul untuk menempel pada sel inang), menstimulasi sel-sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler.<sup>3</sup> Flavonoid yang bersifat lipofilik membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler, dan dengan dinding sel kuman, serta merusak membran sel kuman.<sup>1,3</sup>

Pada umumnya minyak atsiri, tanin dan flavonoid berkhasiat antimikroba dan meningkatkan sistem

imun tubuh dengan menstimulasi sel sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler. Pada penelitian sebelumnya flavonoid yang merupakan senyawa dari polifenol teh hijau telah menunjukkan efek antimikroba dan meningkatkan sistem imun.<sup>7</sup> Dengan persamaan kandungan flavonoid, *Syzygium polyanthum* juga memiliki efek yang sama dengan teh hijau. Dengan efek imunomodulasi tersebut maka tanaman ini dapat digunakan untuk meningkatkan imunitas tubuh terhadap infeksi bakteri patogen fakultatif intraseluler. Salah satu bakteri fakultatif intraseluler adalah *Salmonella typhimurium*.<sup>4</sup>

Masuknya *Salmonella typhimurium* ke dalam tubuh akan memacu terjadinya proses fagositosis oleh makrofag. Adanya kuman *Salmonella typhimurium* dalam makrofag ini akan membuat makrofag tersebut memproduksi IL -12 yang akan menstimulasi sel NK, membantu diferensiasi Th menjadi Th1 . sel ini akan mensekresi IFN –  $\gamma$  yang berfungsi mengaktivasi makrofag untuk memproduksi oksigen reaktif yaitu ROI (*Reactive oxygen intermediate*), dan RNI (*Reactive nitrogen intermediate*) dengan tujuan untuk membantu fungsi efektor makrofag.<sup>8,12</sup>

Kemampuan makrofag membunuh bakteri tergantung pada senyawa oksigen dependent (hydrogen peroxida, single oksigen, hydroxyl radikal, myeloperoxidase, superoxide anion) dan senyawa oxygen independent (lysosom, laktoferin, defensins, hydrolytic enzyme, nitric oxide synthase). Pada penggunaan senyawa oxygen dependent dengan NADPH-oksidadase akan mengubah molekul oksigen menjadi superoksida ( $O_2$ ) lalu diubah menjadi Reaktif Oksigen Intermediate (ROI) seperti peroksida ( $H_2O_2$ ) yang berperan dalam pembunuhan bakteri intraseluler.<sup>10,11</sup> Mekanisme yang ditimbulkan daun salam terhadap infeksi *Salmonella typhimurium* adalah sebagai antibakteri dan meningkatkan aktifitas fagosit.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini meliputi bidang Imunologi, Biokimia, dan Farmakologi, yang di dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajahmada Yogyakarta pada bulan November 2005 sampai Januari 2006. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*.

Sampel penelitian ini diperoleh dari 20 ekor mencit dengan criteria inklusi: mencit strain Balb/c, jantan, umur 6-8 minggu, berat badan 20-25 gram, sehat tanpa ada cacat secara anatomis.<sup>2</sup> Sedangkan kriteria eksklusinya adalah mencit yang mati selama perlakuan. Mencit diadaptasikan selama 1 minggu kemudian dibagi

4 kelompok sebagai berikut :

1. K(-) : kelompok tanpa perlakuan
2. K(+) : diinokulasi *Salmonella typhimurium*
3. P 1 : diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan pada hari kedua diberi ekstrak *Syzygium polyanthum* 56,7 mg/hari selama 5 hari
4. P 2 : diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan pada hari kedua diberi ekstrak teh hijau 390mg/hari selama 5 hari.

Pada hari kelima mencit dibunuh dan diambil cairan peritonealnya untuk pemeriksaan produksi ROI dengan cara reduksi NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) dengan PMA(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) dan non PMA.

Alat dan bahan penelitian ini adalah ekstrak *S. Polyanthum* dosis 56,7 mg/ml/hr diperoleh dengan cara ekstrak etanol, ekstrak teh hijau dengan cara teh hijau diseduh dengan air panas ditunggu dingin diambil dosis 390mg/ml/hr, kuman *Salmonella typhimurium* dosis  $10^6$ ,serta alat dan bahan untuk isolasi makrofag dan pemeriksaan ROI dengan cara reduksi NBT.

Makrofag diperoleh dari sample cairan peritoneum mencit dengan cara menyuntikkan larutan RPMI kedalam rongga peritoneum selanjutnya sample diambil. Aspirat yang didapat kemudian disentrifuse, kemudian Supernatan dicuci 3X dengan RPMI yang mengandung 2% FBS (*fetal bovine serum*) untuk mendapatkan makrofag. Kemudian makrofag dikultur pada microplate 90 well sebanyak  $2,5 \times 10^6$  sel/well dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%, Sel yang didapat diambil 500µl untuk pemeriksaan ROI makrofag. Pemeriksaan produksi ROI dilakukan dengan metode reduksi NBT dengan penambahan PMA dan tanpa PMA.

Data yang diperoleh merupakan data primer dari penghitungan konsentrasi ROI makrofag di laboratorium. Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Kolmogirov-Smirnov*. Bila didapatkan uji data normal dilakukan uji hipotesis dengan menggunakan statistik parametrik uji *one way Analisis of variants*. Setelah itu di lanjutkan analisis dengan *Post Hoc Tes* yaitu *Tamhan test* atau *Bonferoni test* untuk membandingkan tiap kelompok. Sedangkan jika distribusi data tidak nomal maka di lakukan uji hipotesa menggunakan statistik *non parametric uji Kruskal Walls* dilanjutkan *Mann Whitney u*. Analisis data menggunakan *SPSS for Windows* versi 13.0. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variable yang dianalisis memiliki nilai  $p < 0,05$ .

## HASIL

Hasil pemeriksaan ROI makrofag, menunjukkan bahwa ekstrak *Syzygium polyanthum* tidak dapat meningkatkan produksi ROI makrofag, pada statistik menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (+) dan kelompok perlakuan yang diberi teh hijau.

### 1. Pemeriksaan ROI dengan PMA

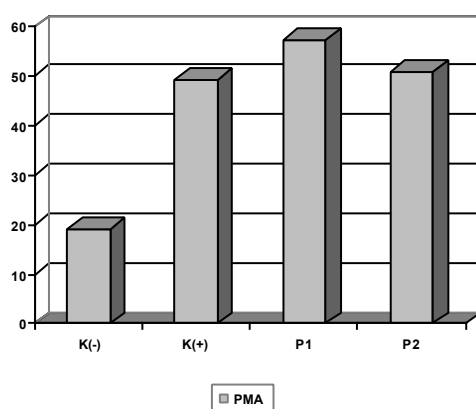
Dari data yang primer yang ada dilakukan uji normalitas dengan *Kolmogorof Smirnov* didapatkan hasil normal, kemudian dilanjutkan dengan uji hipotesis dengan statistik parametrik *One Way ANOVA* Dan analisis data dengan *Post Hoc Test Bonferroni*. Didapatkan hasil tidak bermakna antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan 1 dan 2, seperti pada tabel dan grafik dibawah ini:

Tabel 1. Hasil Analisis Produksi ROI dengan PMA.

Keterangan	Jumlah sampel	Means	SD	Minimum	Maximum
K -	6	19,20	5,167	14	26
K+	6	49,20	10,330	37	62
P1	6	57,20	6,221	50	63
P2	6	51,00	4,183	46	57

Pada tabel diatas tampak produksi ROI kelompok P1 paling tinggi bila dibandingkan dengan kelompok yang lain, tampak dengan nilai rerata tertinggi pada kelompok P1, dan hasil rerata terendah pada kelompok K -.

Grafik 1 dibawah ini menunjukkan rerata produksi ROI keempat percobaan tampak berbeda.



Grafik1. Produksi ROI dengan PMA

Dari *Uji Post Hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok P1 dengan kelompok K+(  $p=0,509$ ) dan P2( $p=1,000$ ) seperti yang terlihat pada tabel 2 berikut ini:

Tabel 2. Nilai p produksi ROI makrofag dengan PMA *Uji Post Hoc Bonferroni*

Kelompok	1(K-)	2(K+)	3(P <sub>1</sub> )	4(P <sub>2</sub> )
----------	-------	-------	--------------------	--------------------

1. Kontrol (-)	-	0,000	0,000	0,000
2. Kontrol (+)	0,000	-	0,509	1,000
3. Perlakuan1 SP 270	0,000	0,509	-	1,000
4. Perlakuan2 TH	0,000	1,000	1,000	-

## 2. Pemeriksaan ROI makrofag Non PMA

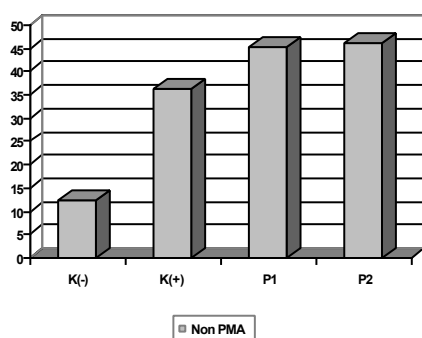
Dari data primer dilakukan uji normalitas didapatkan bahwa data tidak berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji hipotesis non parametrik *Kruskal Wellis Test* dan dilanjutkan uji *Mann whitney* untuk membandingkan antar kelompok. Didapatkan hasil tidak bermakna antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan 1 dan 2, seperti pada tabel dan grafik dibawah ini:

Tabel 3. Hasil Analisis Produksi ROI Non PMA

Keterangan	Jumlah sampel	Means	SD	Minimum	Maximum
K -	6	12,20	3,899	19	19
K+	6	36,40	11,082	23	53
P1	6	45,40	7,603	35	56
P2	6	46,00	9,566	34	59

Pada tabel diatas tampak produksi ROI kelompok P2 paling tinggi bila dibandingkan dengan kelompok yang lain, tampak dengan nilai rerata tertinggi pada kelompok P2, dan hasil rerata terendah pada kelompok K -.

Grafik 2 berikut ini menunjukkan rerata produksi ROI keempat percobaan tampak berbeda. Urutan dari paling rendah sampai ke paling tinggi adalah rerata kelompok K-, K+, P1, dan P2



Grafik2. Produksi ROI dengan Non PMA

Dari Uji *Mann Whitney* didapatkan perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok P1 dengan kelompok K+(  $p=0,173$ ) dan P2( $p=0,917$ ) seperti yang terlihat pada tabel 2 berikut ini:

Tabel 4 nilai p produksi ROI makrofag Non PMA dengan Uji *Mann Whitney*

Kelompok	1(K-)	2(K+)	3(P <sub>1</sub> )	4(P <sub>2</sub> )
----------	-------	-------	--------------------	--------------------



1. Kontrol (-)	-	0,008	0,008	0,008
2. Kontrol (+)	0,008	-	0,173	0,175
3. Perlakuan1 SP 270	0,008	0,173	-	0,917
4. Perlakuan2 TH	0,008	0,175	0,917	-

Pemeriksaan ROI cara reduksi NBT dengan PMA dan Non PMA menunjukkan hasil yang sama yaitu tidak terjadi peningkatan produksi ROI secara bermakna pada P1 bila dibandingkan dengan kelompok K(+) dan P2.

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Syzygium polyanthum* pada mencit balb/c yang telah diinokulasi *Salmonella typhimurium* tidak dapat meningkatkan sekresi ROI oleh makrofag. Secara statistik peningkatan produksi ROI pada P1 tidak bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol(+) yaitu kelompok yang hanya diinfeksi *Salmonella typhimurium* tanpa diberi *Syzygium polyanthum*.

Peningkatan produksi ROI makrofag pada mencit balb/c yang telah diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan diberi *Syzygium polyanthum* dikarenakan kandungan minyak atsiri, tanin dan flavonoid pada *Syzygium polyanthum*. Zat aktif tersebut berkhasiat sebagai antimikroba dan meningkatkan sistem imun tubuh dengan menstimulasi sel - sel fagosit yang berperan dalam respon imun seluler.

Flavonoid yang terdapat *Syzygium polyanthum* sama seperti kandungan the hijau. Dengan adanya zat aktif tersebut memungkinkan terjadi peningkatan produksi IL -12 yang akan menstimulasi sel NK, membantu diferensiasi Th menjadi Th1 . sel ini akan mensekresi IFN –  $\gamma$  yang berfungsi mengaktifasi makrofag untuk memproduksi oksigen reaktif yaitu ROI (Reactive oxygen intermediate).<sup>7,12</sup>

ROI merupakan komponen yang sangat reaktif dalam membunuh dan menghancurkan bakteri. Apabila ROI diproduksi secara terus menerus akan mengakibatkan kerusakan jaringan tubuh yang lain, dengan adanya peningkatan NO akan menghambat efek sitotoksi dari ROI.<sup>11</sup> Didalam peroksisom setiap sel mengandung katalase dan glutathion peroksidase untuk melindungi diri dari kerusakan oksidatif akibat produksi ROI.<sup>11</sup> Adanya mekanisme penghambatan dari NO dan pelindung dari katalase dan glutathion peroksidase tersebut memungkinkan terjadi hambatan terhadap peningkatan produksi ROI seperti pada penelitian ini.

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak *Syzygium polyanthum* tidak dapat meningkatkan produksi ROI makrofag mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

## SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian ekstrak *Syzygium polyanthum* sebagai imunomodulator, untuk meningkatkan sistim imun tubuh terhadap bakteri patogen dengan dosis bertingkat agar mengetahui dosis yang efektif. Sebaiknya dilakukan penelitian untuk masing – masing zat aktif yang terdapat pada *Syzygium polyanthum*, agar mengetahui komponen aktif yang paling berpengaruh sebagai imunomodulator.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan puji syukur kepada Allah SWT atas segala karuniaNya. Terima kasih kepada :

- dr. YL Aryoko Widodo selaku pembimbing,
- dr. Andrew Johan, M.si selaku penguji
- Ibu Istini selaku teknisi LPPT Universitas Gajahmada.
- Kepala dan Staf Laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP
- Kedua orang tua dan teman-teman atas dukunagn dan bantuannya dalam terlaksananya penelitian ini

## DAFTAR PUSTAKA

1. Direktorat Obat Asli Indonesia Badan Pengawas Obat dan Makanan, Salam (*Eugenia polyantha*, Wight), Jakarta. Copyrigt 2004
2. World Health Organization, Research Guidelines For The Safety And Efficacy Of Herbal Medicines. Manila, 1993
3. Warta Tumbuhan Obat Indonesia Volume 5 Nomer 3, Daun Salam (*Eugenia Polyantha Wight*), Jakarta, 1999.
4. Jawets E, Melnick JL, Andelberg E, Brooks Gf, Butel JS, Ornston LN. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi ke 20, Jakarta: EGC, 1996
5. Soebowo. Immunology klinik. Bandung: Angkasa, 1993: 134-8
6. Male D. Immunology, 2<sup>nd</sup> ed. London. Ed Gower. Med, 1993: 49-54
7. Susilaningih N, Andrew Johan, Gunardi, Winarto . Pengaruh polifenol teh hijau dan komponen aktifnya

- terhadap aktifitas makrofag dalam membunuh bakteri, Media Medika Indonesia. Volume 3, Semarang, 2005
8. Bellanti JA. Immunologi Penerjemah. A Samik Wahab. Edisi ke-3. Yogyakarta: Gadjahmada University Press, 1993
  9. Favier . Analysis of free radicals in biological system. Switzerland. Birkhauser Verlag Basel. 1995 ; 1 - 34
  10. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and immunology, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders co, 2000: 3-300, 342-9
  11. Nathan C. Specificity of a third kind: Reactive oxygen and Nitrogen intermediates in cell signaling. New York. 2003; 769-778
  12. Nathan C , Shiloh M.U. Reactive oxygen and Nitrogen intermediates in the relationship between mammalian host and microbial pathogens. New York, 1999; 9-11
  13. Juwono, Rachmat. Demam tifoid. Dalam buku ajar Ilmu Penyakit Dalam, jilid I edisi ketiga. Editor: Noer S, Waspadji S, Rachman AM, Lesmana LA, Widodo D, Isbagio h, Alwi I, dkk. Jakarta: Balai Penerbit FKUI ,1996: 435-41.

#### Lampiran 1

### **PROSEDUR ISOLASI MAKROFAG DARI HEWAN COBA**

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan chloroform. Mencit diletakkan dengan posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alcohol 70%.
2. Suntikkan 10 ml medium RPMI yang mengandung FBS (*fetal bovine serum*) 2% dan antibiotik ke dalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan.
3. Cairan peritoneum diaspirasi dari rongga peritoneum
4. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifuse, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit, supernatant dibuang.
5. Tambahkan 2-3 ml medium komplit.
6. Hitung makrofag dengan hemositometer.
7. Buat suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$  per ml dengan menambahkan medium komplit, masukkan suspensi sel yang telah dihitung kedalam microplate 96 sumuran.
8. inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%.

## Lampiran 2

### **PROSEDUR PEMERIKSAAN PRODUKSI ROI DENGAN CARA REDUKSI NBT**

#### Alat:

1. Mikroskop
2. plate
3. Tabung reaksi alas datar
4. Inkubator
5. Object glass
6. Pinset
7. Coverslip bulat diameter 12 mm
8. Microplate 24 well

#### Bahan:

1. Metanol
2. PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)
3. NBT ( Nitro Blue Tetrazolium ) dilarutkan dengan aquabides 1 mg/ml
4. Neutral Red 2%
5. RPMI
6. PBS ( Phospat Buffer Saline )

#### Prinsip:

Makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresi Anion Superoksid ( $O_2$ ) yang akan mengoksidasi NBT menjadi formazan (tidak larut) dengan pewarnaan Neutral Red tampak butir-butir biru bila dilihat dengan mikroskop cahaya.

#### Cara pemeriksaan sebagai berikut:

1. Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi coversliple bulat, setiap sumuran  $300\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^5$  sel), diinkubasikan dalam inkubator  $CO_2$  5%  $37^\circ\text{C}$  selama 30

menit.

2. Tambahan medium komplet 1 ml/sumuran, diinkubasikan selama 2 jam.
3. Sel dicuci dengan RPMI 2 x, kemudian tambahan medium komplet 1ml/sumuran diinkubasi 24 jam.
4. Setelah itu tambahkan 500  $\mu$ L larutan NBT yang mengandung 125 ng/ml PMA. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja.
5. Sell dicuci dengan PBS 3 x, dikeringkan pada suhu kamar.
6. Fiksasi dengan methanol absolut selama 2-3 menit.
7. Setelah kering warnai dengan 2 % Neutral Red Sol. Selama 15 menit, cuci dengan aquades keringkan pada suhu kamar.
8. Coverslipe diletakan pada objeck glass.

Masing – masing sediaan dibaca pada 100 sel makrofag.

### Lampiran 3

Tabel hasil penghitungan produksi ROI dengan cara reduksi NBT

Keterangan	PMA	Non PMA
Kontrol (-)	26	10
Kontrol (-)	23	19
Kontrol (-)	14	10
Kontrol (-)	15	10
Kontrol (-)	18	12
Kontrol (+)	41	39
Kontrol (+)	50	23
Kontrol (+)	37	36
Kontrol (+)	56	31
Kontrol (+)	62	53
Perlakuan 1	60	48
Perlakuan 1	51	35
Perlakuan 1	50	44

Perlakuan 1	62	44
Perlakuan 1	63	56
Perlakuan 2	53	59
Perlakuan 2	57	50
Perlakuan 2	50	47
Perlakuan 2	49	40
Perlakuan 2	46	34