

The Effect of *Syzygium polyanthum* on Nitric Oxide Production from Macrophage in Balb/c Mice

Inoculated with *Salmonella typhimurium*

Nimim P Zahara¹⁾, Aryoko Widodo²⁾

Abstract

Background: The extract from salam (*Syzygium polyanthum*) is one of herbal medicine used to treat various diseases and it has been used in many countries. *Syzygium polyanthum* contains many substances such as atsiri, tannin, flavonoid and metachavicol that can help bacterial killing and increasing immune response by enhancing phagocytosis. In phagocytosis, activated phagocyte (macrophage and neutrophyl) will secrete NO. The objective of this study is to find the effect of *Syzygium polyanthum* as immunomodulation. It is showed by the raise of nitric oxide production by macrophage of Balb/c strain mice inoculated by *Salmonella typhimurium*.

Method: This study was an experimental study, using *The Posttest Only Control Group Design*. The sample were 20 Balb/c mice and divided into 4 groups randomly. They were: K (no treatment), K+ (inoculated with *Salmonella typhimurium*), DS (inoculated with *Salmonella typhimurium* and treated with *Syzygium polyanthum* extract with dose 56,7 mg, 1 ml/day) and TH (inoculated with *Salmonella typhimurium* and treated with green tea extract). Inoculation at the first day as much as 10^6 , 5 days later the mice killed. *Macrophage* isolated from peritoneal cavity and then the *nitric oxide* was measured.

Results: There was significant difference ($p \leq 0,05$) on the number of macrophage *nitric oxide* production on the DS group and TH group compare to other groups (K and K+).

Conclusion: The *Syzygium polyanthum* treatment with dose 56,7 mg, 1 ml/day peroral to Balb/c mice inoculated by *Salmonella typhimurium* raise the *nitric oxide* production of *macrophage*.

Keywords: *Syzygium polyanthum*, *nitric oxide*, *Salmonella typhimurium*, macrophage.

¹⁾ Student of Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

²⁾ Medical Chemistry Lecturer Staff, Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

Pengaruh Ekstrak *Syzygium polyanthum* Terhadap Produksi Nitrit Oksida (NO) Makrofag Pada Mencit

Balb/c Yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*

Nimim P Zahara¹⁾, Aryoko Widodo²⁾

Abstrak

Latar belakang: Daun salam (*Syzygium polyanthum*) merupakan tanaman obat yang dimanfaatkan untuk mengobati berbagai macam penyakit dan telah digunakan di banyak negara. Daun salam mengandung banyak zat aktif seperti atsiri, tannin, flavonoid dan metachavicol yang dapat berfungsi sebagai antibakteri dan dapat meningkatkan respon imun tubuh dengan cara meningkatkan fagositosis. Pada fagositosis, fagosit yang aktif (makrofag dan neutrofil) akan mensekresi NO. Penelitian ini mencoba untuk melihat efek ekstrak daun salam sebagai imunomodulator. Hal ini dapat dilihat dari peningkatan produksi *nitrit oksida* makrofag pada mencit Balb/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *The Posttest Only Control Group Design*. Sampelnya adalah 20 ekor mencit yang dipilih secara random dibagi menjadi 4 kelompok yaitu: K (control), K+ (diinokulasi *Salmonella typhimurium*), DS (diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak daun salam dosis 56,7 mg, 1 ml/ hari) dan TH (diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak teh hijau). Inokulasi *Salmonella typhimurium* dilakukan pada hari pertama dengan dosis 10^6 dan 5 hari kemudian mencit dibunuh. Makrofag diisolasi dari rongga peritoneum, kemudian kadar NO diukur.

Hasil: Terlihat perbedaan yang bermakna ($p \leq 0,05$) pada produksi *nitrit oksida* makrofag. kelompok DS dan kelompok TH terhadap seluruh kelompok (K dan K+).

Kesimpulan: Pemberian ekstrak daun salam peroral dengan dosis 56,7 mg, sebanyak 1 ml/hari ternyata dapat meningkatkan produksi *nitrit oksida* makrofag mencit Balb/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

Kata kunci: *Syzygium polyanthum*, *nitrit oksida*, *Salmonella typhimurium*, makrofag.

- 1) Mahasiswi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- 2) Staf Pengajar Bagian Kimia Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

PENDAHULUAN

Demam tifoid endemik di Indonesia. Di daerah endemik demam tifoid, insidensi tertinggi didapatkan pada anak-anak. Insidensi pada pasien yang berumur 12 tahun ke atas adalah; 70-80% pasien berumur antara 12-30 tahun, 10-20% antara 30-40 tahun dan hanya 5-10% di atas 40 tahun¹. Hal inilah yang menyebabkan masalah demam tifoid menjadi masalah kesehatan yang penting.

Seiring dengan maraknya pemanfaatan obat tradisional di dunia kedokteran modern maka penelitian terhadap zat yang terkandung dalam obat tradisional semakin gencar dilakukan karena obat tradisional yang telah digunakan secara turun temurun dinilai lebih ekonomis, efektif dan aman. Salah satu tanaman tradisional yang kita kenal dapat dijadikan obat adalah daun salam.

Salam adalah tanaman berupa pohon yang tingginya dapat mencapai 25 m. Tumbuhan dari famili *myrtacea* ini tersebar mulai dari Burma sampai dengan pulau Jawa. Kandungan kimia daun dan kulit batang salam mengandung minyak atsiri, saponin dan flavonoid, disamping itu daunnya juga mengandung alkaloid dan polifenol, sedangkan kulit batangnya juga mengandung tannin². Bagian dari tanaman salam yang biasa digunakan adalah daunnya. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa polifenol yang terdapat pada teh hijau terbukti dapat meningkatkan kadar *NO* pada kultur makrofag³. Oleh karena itulah penelitian ini juga menggunakan teh hijau sebagai pembanding. Uji secara mikrobiologi minyak atsiri daun salam terhadap bakteri penyebab diare seperti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* dan *Escherichia coli* juga telah dilakukan. Dan terbukti bahwa minyak atsiri daun salam dapat menghambat pertumbuhan bakteri^{4,5}. Dengan kandungan yang terdapat pada daun salam, penelitian ini mencoba membuktikan bahwa daun salam dapat meningkatkan respon imun pada mencit Balb/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* seperti halnya pada teh hijau yang

mengandung polifenol.

Salmonella typhi termasuk *Enterobacteriaceae* (kuman enterik batang gram negatif) yang bersifat anaerob fakultatif atau aerob, tak berspora dan intraseluler fakultatif. Komponen dinding selnya dari luar ke dalam yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida. Lipoprotein menghubungkan selaput luar dengan lapisan peptidoglikan. Selaput luarnya merupakan selaput ganda, bagian dalamnya menyerupai komposisi selaput sitoplasmik, sedang fosfolipid lapisan luar diganti dengan molekul lipopolisakarida⁶. Bila tubuh terinfeksi bakteri ini maka sistem imun yang berperan adalah sistem imun intraseluler, dimana sel utama yang berperan adalah sel mononuklear (monosit dan makrofag) serta sel polimorfonuklear (netrofil)⁷.

Nitrit oksida adalah molekul yang tidak berpasangan dan sangat reaktif, dapat berdifusi ke dalam membran sel secara bebas. Proses produksi nitrit oksida diawali dari terpaparnya makrofag oleh lipopolisakarida dari bakteri sehingga jalur produksi *Reactive Nitrogen Intermediate (RNI)* terinduksi. Senyawa RNI yang dihasilkan melalui jalur produksi tersebut dapat merubah senyawa-senyawa amin menjadi bentuk *N-nitroso compounds* (NOC) yang bersifat sitotoksik⁸. Dengan demikian meningkatnya kadar NO makrofag menunjukkan adanya peningkatan aktivitas makrofag dalam proses pembunuhan bakteri intraseluler.

Secara etis penelitian terhadap obat baru tidak dilakukan pada manusia tetapi dicobakan terlebih dahulu pada hewan, maka digunakanlah mencit Balb/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Sehingga didapatkan perumusan masalah bahwa apakah ekstrak daun salam efektif dalam meningkatkan produksi nitrit oksida makrofag dari mencit Balb/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi untuk memperkaya pengetahuan dalam bidang tanaman obat, mengetahui efektifitas ekstrak daun salam dalam meningkatkan produksi NO makrofag mencit Balb/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan sebagai sumber acuan bagi penelitian berikutnya.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dalam kurun waktu 3 bulan, November 2005 sampai Januari 2006. Jenis penelitian merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *the posttest only control group design*. Sampel penelitian 20 ekor mencit dengan kriteria inklusi adalah mencit strain Balb/c, umur 6-8 minggu, berat badan 20-25 gram, jantan dan tidak ada cacat secara anatomis, sedangkan kriteria eksklusinya adalah mencit yang mati selama perlakuan.

Mencit diadaptasikan selama 1 minggu kemudian dibagi secara acak menjadi 4 kelompok yaitu:

- Kelompok K: mencit yang tidak diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan tidak mendapat ekstrak daun salam.
- Kelompok K+: mencit yang hanya diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan tidak mendapat ekstrak daun salam.
- Kelompok SP: mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan mendapat ekstrak daun salam.
- Kelompok TH: mencit yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan mendapat ekstrak teh hijau.

Inokulasi *Salmonella typhimurium* dilakukan pada hari pertama dengan dosis 10^6 . Pada hari berikutnya kelompok DS dan TH diberi perlakuan selama 5 hari. Pada hari ke-6 mencit dibunuh dan dilakukan pemeriksaan sampel, mencit dinarkose menggunakan kloroform. Bagian mencit yang diambil adalah cairan intraperitoneal, yang dicuci dengan larutan RPMI sebanyak 3 kali untuk mendapatkan makrofag. Kemudian makrofag dikultur pada mikroplate well 96 sebanyak $2,5 \times 10^6$ sel/ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kadar CO_2 5 %. Supernatan yang didapat dari hasil pengkulturan makrofag diperiksa kadar nitrit oksidanya menggunakan alat *ELISA Reader* dengan metode Griess⁹.

Data yang dikumpulkan adalah data primer yang didapat dari pembacaan hasil produksi nitrit oksida makrofag. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun salam dengan dosis yang digunakan 56,7 mg sebanyak 1 ml/hari dan pemberian ekstrak teh hijau 25 gram diseduh dengan air panas sebanyak 10 ml kemudian diambil 1 ml. Variabel tergantung berupa kadar nitrit oksida yang diproduksi oleh makrofag dalam pengkulturan. Data yang didapatkan diuji normalitasnya menggunakan *Uji Kolmogorov-Smirnov*, apabila didapatkan data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji statistika parametrik *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Bonferroni* untuk membandingkan tiap kelompok.

HASIL

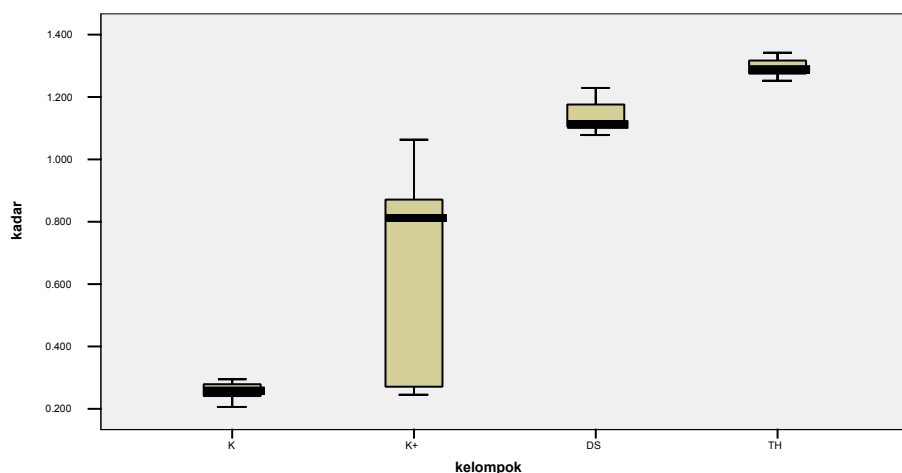
Kadar nitrit oksida dari sampel tiap kelompok perlakuan diukur dengan menggunakan metode *Griess*⁹. Hasil reaksinya dibaca dengan alat *Elisa reader*, dan hasil pengukuran tersebut dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kadar nitrit oksida pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Kelompok	N	Mean	SD	Min	Max
----------	---	------	----	-----	-----

K	5	0,256	0,346	0,206	0,295
K+	5	0,652	0,372	0,245	1,063
DS	5	1,140	0,061	1,078	1,229
TH	5	1.295	0.035	1.252	1.342

Tabel 1 menunjukkan bahwa produksi NO tertinggi terdapat pada kelompok TH, sedangkan produksi NO paling rendah terdapat pada kelompok K. Jika dibandingkan antara kelompok K(+) dan kelompok DS maka terdapat kenaikan yang cukup signifikan dimana pada kelompok K(+) rerata produksi NO-nya adalah 0,652 sedang pada kelompok DS rerata produksi NO-nya adalah 1,140. Dan kelompok yang mempunyai rerata produksi NO paling tinggi adalah kelompok TH yaitu 1,295. Jika data diatas digambarkan dalam grafik maka akan tampak seperti pada grafik 1.



Grafik 1. Boxplot mean kadar nitrit oksida makrofag

Grafik 1 menunjukkan bahwa produksi NO makrofag pada kelompok DS dan TH mengalami peningkatan, dan berdasarkan uji ANOVA terdapat perbedaan yang bermakna karena didapatkan $p=0,001$ ($p \leq 0,05$), kemudian dilanjutkan uji Post Hoc Bonferroni dan hasilnya tampak pada tabel 2.

Tabel 2 Nilai p Produksi NO Makrofag (Uji Post Hoc Bonferroni)

Kelompok	K	K+	DS	TH
K	-	0,27	0,000	0,000
K+	0,27	-	0,006	0,000
DS	0,000	0,006	-	1,000
TH	0,000	0,000	1,000	-

Post Hoc Bonferroni digunakan untuk membandingkan besarnya pengaruh DS dengan TH terhadap K(+) dalam

meningkatkan kadar NO dalam makrofag mencit. Dari tabel terlihat bahwa angka signifikansi DS-K(+) adalah 0,006 sedang untuk TH-K(+) adalah 0,000. Jika Asymptotic Significance semakin menjauhi dari probabilitas 0.05 maka variabel terwakili semakin signifikan perbedaannya. Dari perbandingan kedua angka signifikansi diatas dapat disimpulkan bahwa peningkatan produksi NO karena pemberian ekstrak teh hijau lebih tinggi bila dibandingkan dengan pemberian ekstrak daun salam.

PEMBAHASAN

Makrofag merupakan fagosit profesional yang sangat berperan pada respon imun terhadap infeksi bakteri intraseluler seperti *Salmonella typhimurium*. Terdapat 2 reaksi yang saling melengkapi dalam membunuh bakteri intraseluler yaitu reaksi fagosit oleh makrofag yang diaktivasi oleh IFN- γ yang diproduksi sel limfosit T dan pelisisan sel yang terinfeksi¹⁰.

Makrofag sebagai sel fagosit mampu membunuh kuman dengan menggunakan *senyawa oxygen dependent* dan *senyawa oxygen independent*. Salah satu senyawa oxygen dependent yang digunakan oleh makrofag adalah *Nitric Oxyde (NO)* yang dikatalisis oleh *NOS (Nitric Oxyde Syntase)*¹¹. *NOS* berfungsi sebagai katalis pada reaksi oksidasi dari arginin yang akan menghasilkan NO dan sitrulin dengan menggunakan kofaktor Flavin Adenin Dinucleotida (FAD), Flavin Mononucleotida (FMN), NADPH dan Biopterin H₄ (BH₄)¹². Sitokin yang menginduksi pelepasan NOS untuk masuk ke dalam jalur biosintesa molekul adalah kombinasi antara IFN γ dengan TNF α atau IL-1 maupun lipopolisakarida dari bakteri. NO yang dihasilkan dapat teroksidasi menjadi senyawa RNI (Reactive Nitrogen Intermediate) yang kemudian merubah senyawa-senyawa amin menjadi bentuk N-nitroso compounds (NOC) yang bersifat sitotoksik, yaitu dapat berfungsi dalam penghancuran sel tumor, mikroba, parasit⁸.

Inokulasi *Salmonella typhimurium* pada kelompok yang diberi ekstrak daun salam dan ekstrak teh hijau menunjukkan adanya kenaikan pada produksi NO dibandingkan kelompok K dan K(+). Inokulasi bakteri ini mengaktifkan sistem imun seluler. Limfosit T dan makrofag saling bekerja sama untuk membunuh *Salmonella*. Makrofag akan memfagosit bakteri dan limfosit T berdiferensiasi menjadi sel TCD4⁺ dan sel TCD8⁺. Sel TCD4⁺ berdiferensiasi lagi menjadi Th1 yang kemudian menghasilkan sitokin IFN γ dan TNF α serta memacu sel NK. Sel TCD8⁺ pun menghasilkan sitokin IFN γ . Sitokin-sitokin tersebut akan mengaktifasi makrofag untuk mensekresi senyawa kimia untuk membunuh bakteri dimana salah satu senyawa tersebut yaitu *Nitric Oxyde*

Synthase (NOS) yang akan menghasilkan senyawa NO yang bersifat toksik bagi bakteri^{10,13}. Dengan demikian adanya kenaikan produksi NO pada kelompok DS dan TH menunjukkan bahwa aktivitas pembunuhan terhadap bakteri juga meningkat.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak daun salam menghasilkan produksi NO makrofag yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lain dalam percobaan, demikian pula yang terjadi pada kelompok yang diberikan ekstrak teh hijau. Tetapi kenaikan pada kelompok yang diberi ekstrak teh hijau lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok yang diberi ekstrak daun salam.

SARAN

Agar dilaksanakan penelitian lebih lanjut mengenai efek daun salam sebagai imunopotensiasi dengan dosis yang lebih beragam sehingga dapat diketahui kadar efektif dan kadar toksiknya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT, dan keluarga yang selalu memberikan dukungan.

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. YL Aryoko Widodo M.Kes selaku pembimbing.
2. dr. Andrew Johan, M.Si selaku reviewer proposal dan ketua penguji.
3. dr. Anindita Soetadji Sp.A selaku penguji.
4. Teknisi Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Yogyakarta
5. Semua pihak yang telah memberikan bantuannya selama proses penelitian dan dalam penulisan artikel ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Moehadsjah OK, Wongso S, Nasution AR, Adnan M, Isbagio H, Tambunan S, dkk. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I. Jakarta: Gaya Baru, 1999: 435-436
2. Direktorat Obat Asli Indonesia, Badan Pengawasan Obat dan Makanan. Jl. Percetakan Negara NO.23 Jakarta Indonesia.
3. Susilaningsih N, Johan A, Gunardi, Winarto. Pengaruh Polifenol Teh Hijau Terhadap Aktifitas Makrofag

dalam membunuh Bakteri. *Media Medika Indonesiana*. 2005; 40: 76-81.

4. Warman B. Uji mikrobiologi ekstrak *Eugenia polyantha* Wight terhadap bakteri penyebab diare secara invitro. *JF FMIPA UNAND* 1990. (Abstrak)
5. Sudewi R. Isolasi dan uji antibakteri minyak atsiri daun Salam (*Eugenia polyantha* Wight) *FF UGM* 1992. (Abstrak).
6. Syahrurachman A, Chatim A, Soebandrio A, Kurniawati A, Bela B, Sumarsono F, dkk. Batang Gram Negatif. Dalam: Karsinah, Lucky HM, Suharto, Mardiasuti HW, editor. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara, 1994: 168-173.
7. Bellanti JA. *Imunologi*. Penerjemah A Samik Wahab. Edisi ke-3. Yogyakarta: Gadjahmada University Press, 1993
8. Rodney RD, Joseph HH, Richard EA, Yen Js. Production of Reactive Nitrogen Intermedia Tes By Macrophage in: Burleson GR, Dean JH, MunsonAE, editors. *Methods in Immunotoxicology* 2nd vol. New York: Wiley Liss Inc, 1995, 8: 99-104
9. Theradge MA. *Nitric Oxide Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc, 1998.
10. Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. *Cellular Immunology*. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 2nd ed. Philadelphia: WB Sanders Comp, 1994.
11. Roitt I, Brossof J, Male D. *Immunology*, 6th ed. New York. Mosby, 2001:159-160
12. Johan A. *Lecture Note on Biochemistry For Medical Student: Synthesis and Regulation of Nitric Oxide*. *Media Medika Muda*. 2005; 1:1-5
13. Male D. *Immunology*, 2nd ed. London: Ed Gower. Med, 1993:49-54

Lampiran 1

PROSEDUR ISOLASI MAKROFAG DARI HEWAN COBA

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan chloroform. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%.
2. Suntikkan 10 ml medium RPMI yang mengandung FBS 2% dan antibiotik ke dalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil di tekan-tekan secara perlahan.
3. Cairan peritoneal di aspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan spuit injeksi, pilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifuse, kemudian sentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit.
4. Supernatant dibuang.
5. Tambahkan 2-3 ml complete medium
6. Hitung makrofag dengan hemositometer
7. Buat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ per ml dengan menambah complete medium, masukkan suspensi sel yang telah dihitung kedalam microplate 96 sumuran.
8. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37^0 dengan kadar CO_2 5 %.

Lampiran 2

PROSEDUR PEMERIKSAAN PRODUKSI NO

1. Masukkan 100 μ l reagen Griess (reagen chromogenik) dalam setiap sumuran.
2. Pipet 100 μ l supernatan yang hendak dites atau nitrit standard dalam plate dengan duplikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blanko.
3. Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan chromophore dan stabilisasi.
4. Ukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan automated microplate reader (misal Bio-Tek model EL312).
5. Buat kurva standar menggunakan analisis regresi linier sederhana/ simple dari pembacaan standar NaNO. Hitung konsentrasi sampel berdasarkan kurva standar atau rumus regresi. Bila tidak tersedia microplate reader, dapat digunakan spektrofotometer konvensional.
6. Campur reagen Griess dengan supernatan atau standar NaNO dalam volume yang sama.
7. Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan warna.
8. Ukur absorbansi pada 550 nm (540-550 nm).
9. Buat kurva standar dan hitung konsentrasi nitrit seperti diatas.

Lampiran 3

DATA HASIL PENELITIAN

Kelompok K sampel 1= 0,241
 sampel 2= 0,206
 sampel 3= 0,295
 sampel 4= 0,258
 sampel 5= 0,279

Kelompok K+ sampel 1= 0,871
 sampel 2= 0,812
 sampel 3= 0,271
 sampel 4= 0,245
 sampel 5= 1,063

Kelompok DS sampel 1= 1,112
 sampel 2= 1,176
 sampel 3= 1,078
 sampel 4= 1,105
 sampel 5= 1,229

Kelompok TH sampel 1= 1,342
 sampel 2= 1,275
 sampel 3= 1,317
 sampel 4= 1,288
 sampel 5= 1,252