



**PENGARUH PEMBERIAN REBUSAN BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*
) TERHADAP PRODUKSI *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) MAKROFAG PADA
MENCIT *Balb/c*
YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

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

Disusun Oleh :

**ASIH MARATANI
G2A002028**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006**

LEMBAR PENGESAHAN

ARTIKEL ILMIAH

**PENGARUH PEMBERIAN REBUSAN BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP
PRODUKSI *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) MAKROFAG PADA MENCIT *Balb/c***

YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium*

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Asih Maratani
G2A002028

Telah diuji dan dipertahankan dihadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 8 Agustus 2006 dan telah diperbaiki sesuai saran-saran yang diberikan.

Tim Penguji,

Penguji,

Ketua Penguji,

Drs. Suhardjono, Apt, M.Si
NIP. 130 937 451

dr. Ahmad Ismail
NIP. 132 163 894

Mengetahui,
Pembimbing

dr. Winarto DMM, Sp. M, Sp. MK
NIP.130 675 157

Influence of mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) on the reactive oxygen intermediate (ROI) level of macrophage in *balb/c* mice infected by *Salmonella typhimurium*

Asih Maratani *, Winarto **

ABSTRACT

Background: Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) has been commonly used as a traditional herbal treatment for many diseases. Flavonoid, one of its main contents, is reported to have an immunostimulatory effect against intracellular pathogenic bacterial infections, such as *Salmonella typhimurium*. This effect showed by the increase of phagocytotic action. The activated macrophage would produce ROI to kill the phagocytosed bacteria.

Objective: To find out *Phaleria macrocarpa* could increase ROI production of macrophage in Balb/c mice infected by *Salmonella typhimurium*.

Methods: An experimental laboratory study with a post test only-control group design was done. Samples were 30 female Balb/c mice, 6-8 weeks old, 20-25 grams, and without any physical abnormalities. Random allocation by simple random sampling into 6 groups: (K) was only given daily consumption. (P1) was given *Phaleria macrocarpa* 0.12 ml/day per oral. (P2) was infected by *Salmonella typhimurium* $10^6/0.1$ cc at day-8. (P3), (P4), (P5) each was given *Phaleria macrocarpa* 0.06; 0.12; 0.24 ml/day per oral then infected by *Salmonella*

typhimurium $10^6/0.1$ cc. The ROI level was measured at day-13 using the NBT reduction method.
Result: Mean of ROI level for (K)=0.337; (P1)=0.781; (P2)=0.597; (P3)=0.814; (P4)=1.194; (P5)=1.698.
There was a significant increase showed by non parametric test in experimental group ($p<0.05$).
Conclusion: *Phaleria macrocarpa* could significantly increase the ROI level of macrophage.

Keywords: Flavanoid, mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), phagocyte, ROI

* Student of Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

** Microbiology Lecturer Staff, Faculty of Medicine, Diponegoro University, Semarang

Pengaruh Pemberian Rebusan Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Produksi Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Makrofag Mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Asih Maratani *, Winarto**

ABSTRAK

Latar Belakang: Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) telah banyak digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk berbagai penyakit. Senyawa flavanoid yang terkandung dalam buah mahkota dewa memiliki efek imunostimulan yang dapat digunakan untuk melawan infeksi bakteri patogen intraseluler seperti *Salmonella typhimurium* melalui peningkatan fagositosis. Makrofag teraktivasi akan memproduksi Reactive Oxygen Intermediate (ROI) untuk membunuh bakteri yang difagosit.

Tujuan: Membuktikan bahwa rebusan buah mahkota dewa dapat membuat produksi ROI makrofag pada mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* menjadi lebih tinggi dibanding kontrol.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *post test only control group design*. Sampel penelitian 30 ekor mencit *Balb/c* betina, 6-8 minggu, 20-25 gram serta tidak ada cacat anatomi. Sampel diperoleh dengan cara *simple random sampling*, kemudian dibagi dalam 6 kelompok: (K) hanya diberi pakan standar, (P1) diberi mahkota dewa 0,12 ml/hari per oral. (P2) diinfeksi *Salmonella typhimurium* $10^6/0,1$ cc pada hari ke-8. (P3), (P4), (P5) masing-masing diberi mahkota dewa 0,06; 0,12; 0,24 ml/hari peroral serta diinfeksi pada hari ke-8. Kadar ROI diperiksa pada hari ke-13 dengan cara reduksi Nitroblue Tetrazolium (NBT).

Hasil: Rata-rata jumlah ROI kelompok (K)=0,337; (P1)=0.781; (P2)=0,597; (P3)=0,814; (P4)=1,194; (P5)=1,698. Dengan uji beda non parametrik didapatkan peningkatan bermakna pada kelompok perlakuan ($p<0,05$).

Kesimpulan : Mahkota dewa dapat meningkatkan produksi ROI makrofag pada kelompok perlakuan secara bermakna dibanding kelompok kontrol.

Kata kunci : Flavanoid, mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), fagosit, ROI.

* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

** Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

PENDAHULUAN

Buah dan daun mahkota dewa telah banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia untuk mengatasi berbagai keluhan dan penyakit seperti darah tinggi, liver, kanker, sakit jantung, kencing manis, asam urat, rematik, sakit ginjal. Bagian tanaman yang biasa digunakan sebagai obat adalah daun, daging dan kulit buahnya. Daun dan kulit buah bisa digunakan segar atau yang telah dikeringkan, sedangkan daging buah digunakan setelah dikeringkan.^{1,2}

Dalam kulit buah mahkota dewa terkandung senyawa *alkaloid*, *saponin*, dan *flavonoid*. Sedang dalam daunnya terkandung *alkaloid*, *saponin* dan *polyfenol*. *Flavonoid* memiliki bermacam-macam efek, antara lain sebagai imunostimulan.³

Sebuah penelitian mengenai fungsi imunitas seluler yang dilakukan secara *invivo* pada tikus membuktikan bahwa senyawa *flavonoid* dapat memacu proliferasi limfosit, meningkatkan jumlah sel T dan meningkatkan aktivitas IL-2.⁴

Melalui penelitian yang lain, beberapa jenis *flavonoid* telah terbukti mampu mengautooksidasi serta mengaktifkan *Reactive Oxygen Intermediate (ROI)* seperti H_2O_2 . *Flavonoid* juga berperan dalam mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Fe^{2+} kemudian bereaksi dengan H_2O_2 yang menghasilkan pembentukan radikal hidroksil.⁵

Dengan efek imunostimulan yang terdapat dalam *Phaleria macrocarpa* maka tanaman ini dapat digunakan untuk meningkatkan imunitas tubuh terhadap infeksi bakteri patogen fakultatif intraseluler. Salah satunya yaitu *Salmonella typhimurium*, bakteri yang bersifat patogen terhadap mencit dan memberikan gejala serupa demam tifoid pada manusia.⁶

Respon imun yang terbentuk akibat infeksi *Salmonella typhimurium* adalah tipe *cell-mediated* dan tergantung pada limfosit T dan makrofag yang diaktifkan. Makrofag yang teraktivasi akan memproduksi ROI serta enzim-enzim untuk membunuh bakteri yang difagosit sebagai efektor. Daya bunuh makrofag dengan ROI

merupakan aktivitas yang dilakukan beberapa jam setelah fagositosis. Semakin banyak makrofag teraktivasi pada respon imun maka semakin banyak pula ROI yang diproduksi untuk membunuh *Salmonella*.^{6,7,8}

Berdasarkan fakta-fakta di atas maka penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh pemberian rebusan buah mahkota dewa dengan efeknya sebagai imunostimulan terhadap peningkatan produksi ROI sebagai bagian dari sistem imun dalam melawan bakteri intraseluler.

METODE PENELITIAN

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini meliputi bidang Mikrobiologi dan Imunologi. Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada selama 2 minggu, mulai dari tanggal 21 Juni - 6 Juli 2006.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *post test only control group design*. Sampel pada penelitian ini adalah mencit strain *Balb/c* yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM dengan kriteria inklusi : betina, usia 6-8 minggu, berat 20-25 gram serta tidak memiliki cacat anatomi. Sedangkan kriteria eksklusinya : mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif) dan terdapat abnormalitas anatomi yang tampak

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO, yaitu minimal lima ekor per kelompok.⁹ Pada penelitian ini terdapat satu kelompok kontrol (K) dan lima kelompok perlakuan (P1-5) Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *simple random sampling*.

Variabel penelitian meliputi rebusan mahkota dewa sebagai variabel bebas serta kadar ROI yang diproduksi makrofag sebagai variable tergantung.

Alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian yaitu rebusan mahkota dewa yang diperoleh dari produk PT. Mahkota Dewa Indonesia (lampiran 1), sonde lambung alat dan bahan untuk mengisolasi makrofag mencit (sprit steril 10 cc, sentrifuge, tabung sentrifuge, larutan RPMI, larutan FBS), cairan peritoneal mencit, serta alat dan bahan untuk pemeriksaan ROI dengan cara reduksi NBT (microplate 12 well, cover slip bulat, inkubator, larutan RPMI, NBT, PBS, Neutral Red Sol, mikroskop)

Dosis rebusan mahkota dewa yang digunakan berdasarkan perbandingan berat badan mencit (20 gr) dengan dosis pada manusia (50 kg). Kelompok kontrol (K) hanya diberi pakan standar, Perlakuan 1 (P1) diberi

mahkota dewa 0,12 ml/hari peroral. P2 diinfeksi *Salmonella typhimurium* $10^6/0,1$ cc pada hari ke-8. P3, P4, P5 masing-masing diberi mahkota dewa 0,06; 0,12; 0,24 ml/hari peroral serta diinfeksi *Salmonella typhimurium* $10^6 / 0,1$ cc pada hari ke-8.

Pada hari ke-13 dilakukan terminasi mencit. Makrofag diisolasi melalui cairan peritoneal yang diaspirasi dari rongga peritoneum mencit yang sebelumnya ditambah larutan RPMI. Kemudian disentrifuge beberapa kali hingga didapatkan endapan fagosit murni. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran kadar ROI dengan *Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay* menurut Leih et al (1986). Produksi ROI ditentukan berdasarkan jumlah presipitat dalam setiap 200 sel makrofag yang dibagi dalam derajat 1-4 :

Derajat 1 (D1) : luas presipitat <25 %

Derajat 2 (D2) : luas presipitat 25-50 %

Derajat 3 (D3) : luas presipitat 50-75 %

Derajat 4 (D4) : luas presipitat > 75 %

Adapun hasil perhitungan akhirnya sebagai berikut :

$$\frac{(\sum D1) + 2(\sum D2) + 3(\sum D3) + 4(\sum D4)}{200 \text{ sel}}$$

Kemudian dilakukan analisa deskriptif dengan perhitungan ukuran kecenderungan sentral dan dispersi (mean ± SD). Data primer yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS 13.0 *for windows*.

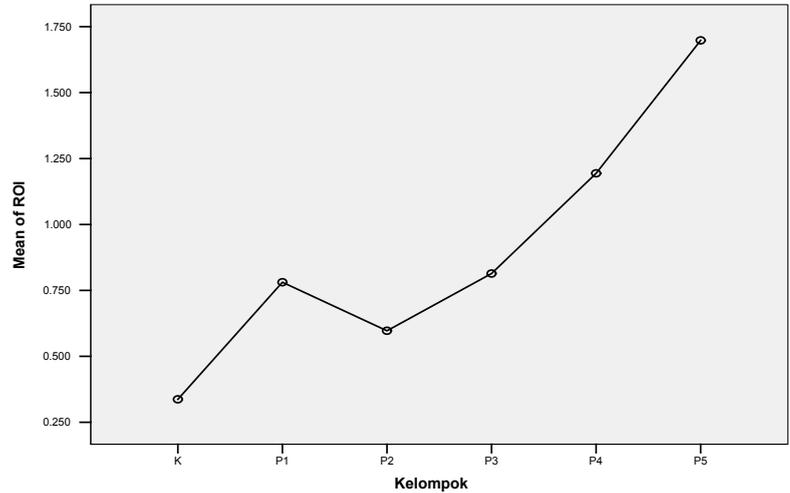
Data penelitian berjumlah 30, sehingga diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro Wilk*. Karena didapatkan distribusi data yang tidak homogen $p=0,034$ (normal $p>0,05$), maka dilakukan uji beda non parametrik *Kruskal Wallis*. Hasilnya didapatkan $p=0,000$ yang artinya terdapat perbedaan sangat bermakna ($p \leq 0,01$), sehingga dilanjutkan dengan uji beda non parametrik *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan antar tiap kelompok.

HASIL

Tabel 1. Data jumlah ROI per 200 sel makrofag

Kelompok	Mean	SD
K	0,337	0,098
P1	0,781	0,069
P2	0,597	0,156

P3	0,814	0,165
P4	1,194	0,180
P5	1,698	0,302



Gbr. 1. Mean plot produksi ROI makrofag

Tabel 2. Uji Mann-Whitney : perbandingan tiap kelompok

	K	P1	P2	P3	P4	P5
P1	0,009	-	-	-	-	-
P2	0,016	0,028	-	-	-	-
P3	0,009	0,916	0,047	-	-	-
P4	0,009	0,009	0,009	0,016	-	-
P5	0,009	0,009	0,009	0,009	0,021	-

Berdasarkan tabel dan grafik di atas, jumlah ROI terendah terdapat pada kelompok kontrol (K) yaitu 0,337 (SD 0,098) dan terjadi peningkatan pada semua kelompok perlakuan dibanding kontrol. Dapat dilihat pula bahwa peningkatan jumlah ROI pada infeksi *S. typhimurium* (P1) lebih tinggi dibanding pada pemberian mahkota dewa 0,12 ml tanpa infeksi (P2). Terdapat peningkatan tidak bermakna antara infeksi *S. typhimurium* (P1) dengan pemberian mahkota dewa 0,06 ml dengan infeksi (P3). Namun dengan peningkatan dosis mahkota dewa pada infeksi dalam jumlah kuman yang sama, terjadi peningkatan jumlah ROI yang bermakna dimana nilai tertinggi pada kelompok dengan dosis mahkota dewa 0,24 ml/hari (P5). Hal ini menunjukkan adanya ketergantungan produksi ROI makrofag terhadap dosis mahkota dewa (*dose dependence*).

PEMBAHASAN

Dalam kulit buah mahkota dewa terkandung senyawa *alkaloid*, *saponin*, dan *flavanoid*. Sedang dalam daunnya terkandung *alkaloid*, *saponin* dan *polyfenol*.¹⁰ Pada penelitian ini kandungan *flavonoid* terbukti dapat efektif dalam peningkatan produksi ROI makrofag terhadap infeksi *Salmonella typhimurium* melalui proses fagositosis.

Pada fagositosis, sel T akan memproduksi IL-2 untuk diferensiasi sel T menjadi sel TCD4⁺ ataupun sel TCD8⁺ yang bersifat sitolitik. Makrofag akan mengeluarkan IL-12 yang akan membantu diferensiasi sel T menjadi sel Th₁. Sel ini akan menghasilkan sitokin-sitokin seperti TNF- α dan IFN- γ untuk mengaktivasi makrofag serta memacu sel NK.^{6,7}

Jika bakteri dapat bertahan pada sel dan melepaskan Ag ke sitoplasma, Ag tersebut akan menstimulasi sel TCD8⁺. Sel tersebut akan menghasilkan IFN- γ dalam mengaktivasi makrofag dan memproduksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) serta enzim, serta juga bekerjasama dengan sel NK untuk membunuh bakteri melalui pelisisan sel yang terinfeksi.^{7,8}

Dengan demikian, efek imunostimulan dari rebusan kulit buah mahkota dewa dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dari makrofag yang ditandai dengan adanya peningkatan produksi ROI sebanding dengan dosis mahkota dewa pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol.

KESIMPULAN

Pemberian rebusan buah mahkota dewa dengan dosis bertingkat dapat menyebabkan produksi ROI makrofag pada kelompok perlakuan lebih tinggi secara bermakna dibanding kontrol.

SARAN

Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut tentang pengaruh rebusan buah mahkota dewa terhadap infeksi dengan dosis efektif serta penelitian efek mahkota dewa yang dikombinasikan dengan tanaman-tanaman obat lain yang beredar di pasaran.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan Puji Tuhan atas penyertaannya dan hikmat pengetahuan yang telah diberikan selama pembuatan Karya Tulis Ilmiah ini. Selain itu, penulis juga mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. dr. Winarto DMM, Sp. M, Sp. MK
2. dr. Akhmad Ismail
3. Drs. Suhardjono, Apt, M.Si.
4. Ibu Listini, Staf LPPT UGM
5. Teman kelompok KTI, keluarga dan sahabat
6. Semua pihak yang telah sangat membantu selama penelitian dan penulisan artikel ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lisdawati, V. *Buah mahkota dewa (Phaleria macrocarpa [Scheff] Boerl.) toksisitas antioksidan dan efek antikanker berdasarkan uji penapisan farmakologi*. Available from: URL: <http://www.mahkotadewa.com/vpc/vivi.htm>
2. Dalimartha, S. *Atlas tumbuhan obat Indonesia*. Available from: URL: http://www.pdpersi.co.id/pdpersi/news/alternatif_dalam.php3.
3. Gotama, I.B.I., Sugiarto, S., Nurhadi, M., Widyastuti, Y., Wahyono, S., Prapti, I.J. *Inventaris Tanaman obat Indonesia, jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 1999.
4. Jiao Y., Wen J., Yux. *Influence of flavanoid of astragalus membranaceus' stem and leaves on the function of cell mediated immunity in mice*. Heilongjiang University. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
5. Anonymous. Available from : URL : http://www.landfood.ubc.ca/courses/fnh/410/lipids/5_5.htm
6. Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. *Cellular Immunology in: Cellular and molecular immunology, 2nd ed*. Philadelphia: WB. Saunders Company, 1994.
7. Hyde R.M. *Immunology, 3rd ed*. Philadelphia: William and Wilkins, 1995.
8. Stewart FS. *Bigger,s bacteriology and immunology for students of medicine, 9th ed*. Norfol Lowland Brydone Ltd, 1974.
9. *Research guideline for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine* . Manila : WHO Regional Office for The Western Pasific. 1993 : 35
10. Harmanto, N. *Mahkota Dewa : Obat pusaka para dewa*. Jakarta : Agromedia Pustaka, 2003.

Lampiran 1

REBUSAN PHALERIA MACROCARPA

Alat:

1. Panci untuk merebus
2. Penyaring
3. Gelas ukur

Bahan:

1. MADE I produksi PT. MDI yang berupa irisan buah mahkota dewa kering.
2. air 600 ml

Cara pembuatan :

Berdasarkan aturan pakai ramuan MADE I :

1. 5 iris buah direbus dalam 600 ml air hingga mencapai setengahnya (300 ml)
2. 300 ml rebusan dikonsumsi per hari dalam dosis 3 x 100 ml.

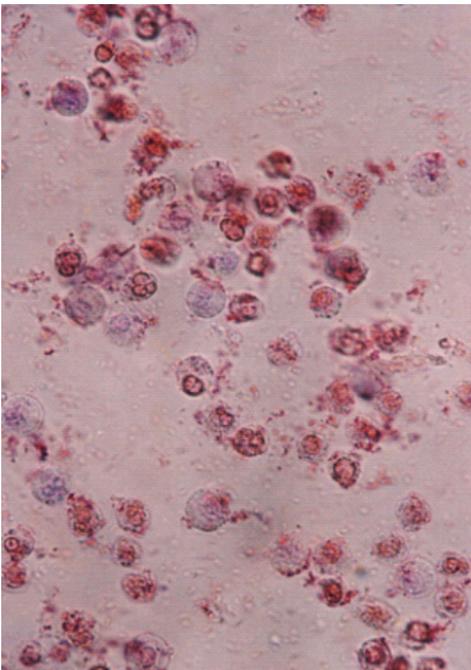
Adapun konversi dosis *Phaleria macrocarpa* berdasarkan berat badan pada mencit 20 gram dibandingkan pada manusia dengan berat 50 kg yaitu :

$$\frac{20 \text{ gr}}{50.000 \text{ gr}} \times 300 \text{ ml/hari} = 0,12 \text{ ml/hari}$$

Sehingga dosis yang dipergunakan pada tiap kelompok per hari sebagai berikut :

Kelompok P1	=	0,12 ml	
Kelompok P3	=	$\frac{1}{2} \times 0,12 \text{ ml}$	= 0,06 ml
Kelompok P4	=	0,12 ml	
Kelompok P5	=	$2 \times 0,12 \text{ ml}$	= 0.24 ml

Lampiran 2



Preparat kelompok P5 (mahkota dewa 0,24 ml/hari + infeksi *S.typhimurium* $10^6/0,1 \text{ cc}$)

Hasil perhitungan jumlah ROI tiap kelompok

K	P1	P2	P3	P4	P5
0,375	0.870	0.695	1.080	1.105	2.015
0.230	0.815	0.385	0.800	1.265	1.760
0.315	0.800	0.565	0.625	1.105	1.475
0.280	0.710	0.795	0.765	1.020	1.305
0.485	0.710	0.545	0.800	1.475	1.935