

## ABSTRACT

**Background:** Macrophage eliminates intracellular microorganism by secreting microbicidal agent nitric oxide and ingest bound microorganism into vesicle to be destroyed. Macrophage functions influenced by antioxidant. Roselle tea component has an antioxidant activity that can modulate macrophage functions.

**Objective:** This study aimed to analyze the effect of roselle tea on macrophage nitric oxide production and macrophage phagocytosis capability.

**Method:** A post test-only controlled group design experiment was carried out on 4-6 weeks old, male Balb/c mice, infected with *Salmonella typhimurium*  $10^5$  CFU. The treatments given in 7 days were giving orally with roselle tea 2x0,24 ml each day (P1), 2x0,5 ml each day (P2), 2x0,98 ml each day (P3). Positive control group infected with *Salmonella typhimurium*  $10^5$  CFU, received water 2x1 ml each day. Negative control group received water 2x1 ml each day. The parameters of macrophage functions were nitric oxide production, and macrophage phagocytosis capability represent on phagocytosis index. Nitric oxide production was measured by determine the NO level from macrophage supernatant using modified Griess method. Macrophage phagocytosis capability was measured by using latex bead particle which represented by phagocytosis index. Data were analyzed by Kruskal Wallis test.

**Result:** There was no difference on the nitric oxide production between the experiment group and control group ( $p=0,053$ ). There was significant decrease on the macrophage phagocytosis capability represent by phagocytosis index ( $p=0,001$ ) between the experiment and positive control groups.

**Conclusion:** Roselle tea does not interference the macrophages nitric oxide production, but decrease the macrophage's phagocytic function.

**Keywords:** Macrophage nitric oxide production, phagocytosis index, roselle tea.

**ABSTRAK**

**Latar belakang :** Makrofag berfungsi mengeliminasi mikroorganisme intraseluler dengan mensekresi agen mikrobisidal nitrit oksida dan memfagositnya. Fungsi makrofag dipengaruhi oleh antioksidan. Teh kelopak rosela mengandung senyawa aktif yang berkapasitas sebagai antioksidan yang meningkatkan fungsi makrofag.

**Tujuan :** Untuk mengetahui pengaruh teh kelopak rosela terhadap produksi nitrit oksida makrofag dan kemampuan fagositosis makrofag.

**Metode :** Dilakukan suatu penelitian eksperimental dengan rancangan *post test-only controlled group*, menggunakan hewan coba mencit Balb/c jantan, usia 4-6 minggu, yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*  $10^5$  CFU. Perlakuan yang diberikan selama 7 hari berupa pemberian teh rosela per oral 2x0,24 ml per hari (P1), 2x0,5 ml per hari (P2), 2x0,98 ml per hari (P3). Kelompok kontrol positif dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium*  $10^5$  CFU, tanpa pemberian teh kelopak rosela, hanya diberi air 2x1 ml per hari. Kelompok kontrol negatif tidak dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi air 2x1 ml per hari. Fungsi makrofag dinilai dengan parameter produksi nitrit oksida makrofag, dan kemampuan fagositosis makrofag. Produksi nitrit oksida diukur jumlah NO dari supernatan makrofag menggunakan reagen Griess dengan metode modifikasi Griess. Kemampuan fagositosis makrofag diperiksa dengan menggunakan partikel *latex bead* dinyatakan dalam indeks fagositosis. Data dianalisis menggunakan uji Kruskal Wallis.

**Hasil :** Tidak ada perbedaan bermakna pada produksi nitrit oksida antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif ( $p=0,053$ ). Terdapat perbedaan bermakna pada kemampuan fagositosis makrofag dinyatakan dalam indeks fagositosis ( $p=0,001$ ) yang lebih rendah pada semua kelompok perlakuan dibanding kontrol positif.

**Simpulan :** Teh kelopak rosela tidak mempengaruhi kemampuan produksi nitrit oksida makrofag, tetapi menurunkan/ merendahkan kemampuan fagositosis makrofag.

## **PENDAHULUAN**

Respon imun adalah respon yang ditimbulkan oleh sel-sel dan molekul yang menyusun sistem imunitas setelah berhadapan dengan substansi asing.<sup>1</sup> Respon imun bertanggung jawab mempertahankan kesehatan tubuh, yaitu mempertahankan tubuh terhadap serangan sel patogen maupun sel kanker.<sup>2</sup>

Respon sistem imun tubuh kita pasca rangsangan substansi asing (antigen) adalah munculnya sel fungsional yang akan menyajikan antigen tersebut kepada limfosit untuk dieliminasi. Setelah itu muncul respon imun nonspesifik dan/ atau respon imun spesifik, tergantung kondisi “survival” antigen tersebut. Apabila dengan respon imun non-spesifik sudah bisa dieliminasi dari dalam tubuh, maka respon imun spesifik tidak akan terinduksi.<sup>3</sup> Apabila antigen masih bisa bertahan hidup, maka respon imun spesifik akan terinduksi dan akan melakukan proses pemusnahan antigen tersebut.

Respon imun seluler bertujuan untuk mengeliminasi mikroorganisme intrasel dan terutama dilakukan oleh limfosit T.<sup>1,3</sup> Aktifasi limfosit membutuhkan paparan antigen dan stimulus dari sinyal-sinyal yang berasal dari mikroorganisme atau berasal dari respon imun alamiah terhadap mikroorganisme tersebut.<sup>1</sup> Terdapat 3 kelas limfosit, yaitu limfosit T dengan 2 subkelas, limfosit *Helper* dan T sitolitik (CTL), kelas kedua adalah limfosit B, dan kelas ketiga adalah sel NK.<sup>4</sup>

Limfosit T, akan mengaktifkan makrofag melalui sinyal dari interaksi CD40L-CD40 dan sinyal dari sitokin IFN- $\gamma$ . Respon yang muncul adalah meningkatnya beberapa molekul yang diproduksi oleh makrofag. Molekul tersebut antara lain *reactive oxygen intermediates (ROI)*, *nitrit oxide (NO)*, *lysosomal enzymes*, sitokin TNF, IL-1, IL-12.<sup>4</sup>

Makrofag yang teraktifasi merupakan sel efektor dalam imunitas seluler dan berfungsi mengeliminasi mikroba terfagosit. Makrofag yang teraktifasi akibat stimulus berbagai sinyal aktifasi akan membunuh mikroorganisme yang terfagosit, dengan cara memproduksi *reactive oxygen intermediates*, *nitrit oxide*.<sup>4</sup>

*Nitrit oxide* merupakan molekul yang memiliki banyak aktifitas, salah satu aktifitasnya yang terkait dengan makrofag adalah merupakan agen mikrobisidal kuat terhadap mikroorganisme intrasel.<sup>5</sup>

Fungsi makrofag muncul apabila makrofag mengalami aktifasi. Aktifasi makrofag oleh berbagai sinyal aktifasi dipengaruhi oleh faktor eksternal dan internal. Yang termasuk faktor eksternal adalah makanan, pola makan. Faktor internal meliputi persarafan parasimpatis saraf vagus, flora normal lumen usus, hormon leptin, usia, status gizi, aktifitas.<sup>6-12</sup> Faktor makanan tersebut berupa asam askorbat, asam amino arginin, polifenol, flavonoid, fitoestrogen, probiotik, dan *Echinacea* sp.<sup>2, 14-23</sup>

Akhir-akhir ini masyarakat mulai menggemari konsumsi teh rosela yang dimanfaatkan sebagai minuman kesehatan, yang memberikan manfaat berupa perbaikan fungsi hepar dan darah.<sup>16</sup> Manfaat lain dari mengkonsumsi teh rosela adalah mampu meningkatkan daya tahan tubuh (imunitas), mencegah penyakit jantung koroner, menstabilkan tekanan darah, menormalkan beberapa parameter kimia klinik (gula darah, asam urat, profil lipid), frekuensi diare, mengontrol berat badan (mencegah dan menurunkan obesitas), kadar hemoglobin, fungsi kognisi.<sup>17-21</sup>

Kelopak rosela mengandung beberapa senyawa kimia yang diperlukan oleh tubuh yaitu campuran asam sitrat dan asam malat, *anthocyanin hydroxyflavone dan hibiscin*, vitamin C dan asam amino.<sup>17</sup>

Pada penelitian ini fungsi makrofag dilihat dengan menginduksi mencit dengan pemberian *Salmonella typhimurium*. *Salmonella typhimurium* adalah basil gram negatif anaerob fakultatif intraseluler. *Salmonella* mengandung faktor stimulator respon imun *host* yaitu lipopolisakarida (LPS).<sup>22</sup>

Dosis pemberian larutan kelopak rosela didasarkan pada konversi dosis manusia dewasa ke mencit menurut Laurence & Bacharach (1964) yaitu dosis manusia dikali 0,0026.<sup>23</sup> Dosis penggunaan teh kelopak rosela yang lazim adalah dengan cara menyeduh 3 kelopak bunga rosela kering dengan 250 ml air mendidih, dikonsumsi 3 kali sehari, sehingga didapatkan dosis lazim untuk mencit adalah 3 x 0,65 ml per hari.

Penelitian ilmiah yang meneliti tentang pengaruh konsumsi teh rosela terhadap fungsi makrofag masih terbatas.

Berdasarkan hal tersebut, maka peneliti ingin mengetahui sejauh mana pengaruh teh rosela dapat meningkatkan fungsi makrofag, yaitu dalam kemampuan memproduksi nitrit oksida dan kemampuan memfagosit.

## **METODE**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test-only controlled group*, yang menggunakan binatang percobaan sebagai subyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian teh kelopak rosela, pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan bakteri *Salmonella typhimurium*. Parameter pengukuran variable berupa produksi NO makrofag dan fungsi fagositosis makrofag.

Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah Ilmu Gizi dan Imunologi. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Yogyakarta selama dua bulan.

Dosis pemberian larutan kelopak rosela didasarkan pada konversi dosis manusia dewasa ke mencit menurut Laurence & Bacharach (1964) yaitu dosis manusia dikali 0,0026.<sup>23</sup> Dosis penggunaan teh kelopak rosela yang lazim adalah dengan cara

menyeduh 3 kelopak bunga rosela kering dengan 250 ml air mendidih, dikonsumsi 3 kali sehari, sehingga didapatkan dosis lazim untuk mencit adalah  $3 \times 0,65$  ml per hari.

Pada penelitian ini diberikan 3 dosis yang berbeda, yaitu  $\frac{1}{2}$  x dosis lazim, 1 x dosis lazim, dan 2 x dosis lazim. Dasar pemberian  $\frac{1}{2}$  x dosis adalah mempertimbangkan faktor efisiensi, yaitu dengan harapan melalui pemberian  $\frac{1}{2}$  x dosis sudah memberikan hasil yang menunjang hipotesis, maka dapat menghemat penggunaan kelopak rosela. Dasar pemberian 2 x dosis adalah untuk mengantisipasi apabila pemberian 1 x dosis belum memunculkan hasil yang mendukung hipotesis.

Mengingat bahwa asupan air mencit adalah 15 ml/100 gram/hari, sehingga jika diberikan dalam jumlah lebih dari 1 ml pada satu kali pemberian akan menyebabkan overhidrase dan distensi lambung, maka dalam penelitian ini prosedur pembuatan teh kelopak rosela adalah dengan menyeduh 6 kelopak rosela dalam 250 ml air mendidih kemudian diambil 0,325 ml sebagai patokan 1 x dosis lazim.<sup>24</sup>

Mengingat bahwa frekuensi pemberian sonde sebanyak 3 x per hari adalah dapat menimbulkan iritasi dan stres terhadap mencit, maka pemberian perlakuan dilakukan sebanyak 2 x per hari dengan penyesuaian volume.

Populasi pada penelitian ini adalah mencit Balb/c. Strain yang dipilih adalah Balb/c sebab strain ini dapat menimbulkan respon imun apabila dinokulasi dengan *Salmonella typhimurium* hidup.

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit Balb/c karena merupakan mencit yang sering digunakan pada penelitian bertujuan umum maupun penelitian di bidang imunologi.<sup>25</sup>

Pada penelitian ini fungsi makrofag mencit diinduksi dengan pemberian *Salmonella typhimurium*. *Salmonelle typhimurium* adalah basil gram negatif anaerob fakultatif intraseluler. *Salmonella* mempunyai faktor stimulator respon imun *host* berupa lipopolisakarida (LPS).<sup>22</sup>

Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan ketentuan dari WHO jumlah sampel minimal 5 pada tiap kelompok perlakuan.<sup>26</sup> Pada penelitian ini menggunakan 6 ekor mencit per kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan sebanyak 30 ekor mencit, untuk mengantisipasi *drop-out*.

Kriteria inklusi meliputi galur murni Balb/c; jenis kelamin jantan; umur 4-6 minggu; berat badan 20-30 gram; aktif, sebelum diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Kriteria eksklusi adalah mencit cacat sebelum perlakuan.



Variabel bebas dalam penelitian ini adalah teh kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa L.* dengan dosis bervariasi. Teh kelopak rosella dibuat dengan cara 6 (enam) kelopak kering bunga rosella, yang diseduh dalam 250 ml air mendidih, didiamkan selama 15 menit, diambil airnya, dan diberikan kepada kelompok perlakuan 1 dengan dosis 2 x 0,24 ml/hari; diberikan kepada kelompok perlakuan 2 dengan dosis 2 x 0.5 ml/ hari, dan diberikan kepada kelompok perlakuan 3 dengan dosis 2 x 0.98 ml/ hari melalui sonde lambung.

Variabel tergantung penelitian ini adalah fungsi makrofag yang dalam penelitian ini diukur dengan parameter (1) Produksi nitrit oksida makrofag, diukur jumlah nitrit oksida dari supernatan makrofag menggunakan reagen Griess dengan metode modifikasi Griess menurut Green dkk (1982) dan Ding dkk (1988), yang dinyatakan dalam satuan  $\mu\text{M}$ ; dan (2) Kemampuan fagositosis makrofag diperiksa dengan menggunakan partikel *latex bead* yang dinyatakan dalam satuan indeks fagositosis.

Variabel kendali penelitian ini adalah *Salmonella typhimurium* sebagai imunogen. *Salmonella typhimurium* yang digunakan sebagai strain *Salmonella* virulen dengan LD50  $10^6$  CFU, sehingga dosis yang digunakan untuk pemeriksaan imunitas seluler adalah  $10^5$  CFU, yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP.

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standard, kemudian dilakukan

pengelompokan dengan acak sederhana, 30 ekor mencit dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok P1-3 diberi pakan standard dan larutan kelopak rosella setelah 12 jam injeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal pada hari ke-1 dengan dosis yang sudah ditetapkan selama 7 hari. Pada hari ke-8 semua mencit diterminasi untuk diambil cairan peritoneal untuk kultur makrofag untuk pemeriksaan produksi nitrit oksida dan fagositosis makrofag. Kelompok K1 diberi pakan standard selama 7 hari, dilakukan injeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal namun tidak diberi teh kelopak rosella hanya diberi air, sedangkan kelompok K2, merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama seperti kelompok lainnya.

Prosedur pemeriksaan produksi nitrit oksida supernatan makrofag menggunakan metode modifikasi Griess menurut Green dkk (1982) dan Ding dkk (1988). Prosedur pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag adalah melalui tahap isolasi makrofag mencit dan tahap fagositosis makrofag dengan *latex beads*. Tahap isolasi makrofag mencit adalah dengan cara mencit diterminasi dengan dislokasi cervix, mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit abdomen dibuka sehingga tampak peritoneum kemudian dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diinjeksi dengan 10cc 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 sentrifuse steril. Cairan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Bila cairan

terkontaminasi darah, maka cuci sel-sel tersebut dengan PBS sampai bersih. Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3 cc medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10%, penicillin, streptomycin, dan glutamin. Sel-sel dihitung dengan hemasitometer setelah dilarutkan dalam asam asetat 3% untuk melisiskan eritrosit, kemudian diresuspensi 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 wells* dasar rata, masing-masing sumuran 200  $\mu$ l (kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/ml) dan pada dasarnya diberi *coverslip*, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml dalam tiap sumuran dan diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu sel dicuci RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplit 1 ml dalam tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam. Tahap pemeriksaan fagositosis makrofag dengan *latex beads* adalah dengan menginkubasikan suspensi makrofag yang telah dikultur pada *microplate 24 wells* yang telah diberi *coverslips*, setiap sumuran 200  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$ ) dalam CO<sub>2</sub> 5% 37°C selama 30 menit. Kemudian menambahkan medium komplit 1 ml setiap sumuran, inkubasikan selama 24 jam. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci dengan RPMI 2 kali. *Latex beads* diresuspensikan sehingga didapatkan konsentrasi 10 kali lipat. Selanjutnya menambahkan suspensi latex 200  $\mu$ l/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C pada inkubator CO<sub>2</sub>. Mencuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit. Selanjutnya dikeringkan pada suhu ruang, dan difiksasi dengan methanol absolut. Setelah kering, *coverslips* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit. Selanjutnya dicuci dengan

aquadest, diangkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar. Setelah kering di-*mounting* pada kaca objek. Menghitung kemampuan fagosit adalah dari prosentase sel yang memfagosit partikel latex yang kemudian dihitung pada 200 sel dikali jumlah rata-rata partikel pada sel yang positif dan dinyatakan dalam indeks fagositosis.

Data yang diperoleh dilakukan *editing*, *coding* dan *entry* dalam file komputer. Setelah dilakukan *clearing*, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program SPSS 15.0. Analisis deskriptif menampilkan nilai rerata dan simpangan baku dari variabel tergantung (prosentase limfosit). Hasil ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik batang. Untuk uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilks*. Data yang terdistribusi normal dilakukan uji *One way ANOVA* dilanjutkan *post hoc test Bonferroni*. Data yang terdistribusi tidak normal akan dilakukan uji Kruskal Wallis. Nilai signifikansi dalam penelitian dengan hasil analisis  $p < 0,05$ .

## **HASIL**

Penelitian dilakukan selama bulan Mei hingga Juni 2009 di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu UGM Yogyakarta dan Laboratorium CEBIOR Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang. Sampel penelitian pada awal penelitian berjumlah 30 ekor mencit Balb/C, dan pada akhir penelitian berjumlah 27 ekor mencit. Satu ekor mencit mati pada kelompok perlakuan 3 (P3), satu ekor mencit kelompok kontrol 1

(K1) dan satu ekor mencit kelompok kontrol 2 (K2). Sehingga diperoleh 27 sampel untuk perhitungan indeks fagosit dan konsentrasi NO.

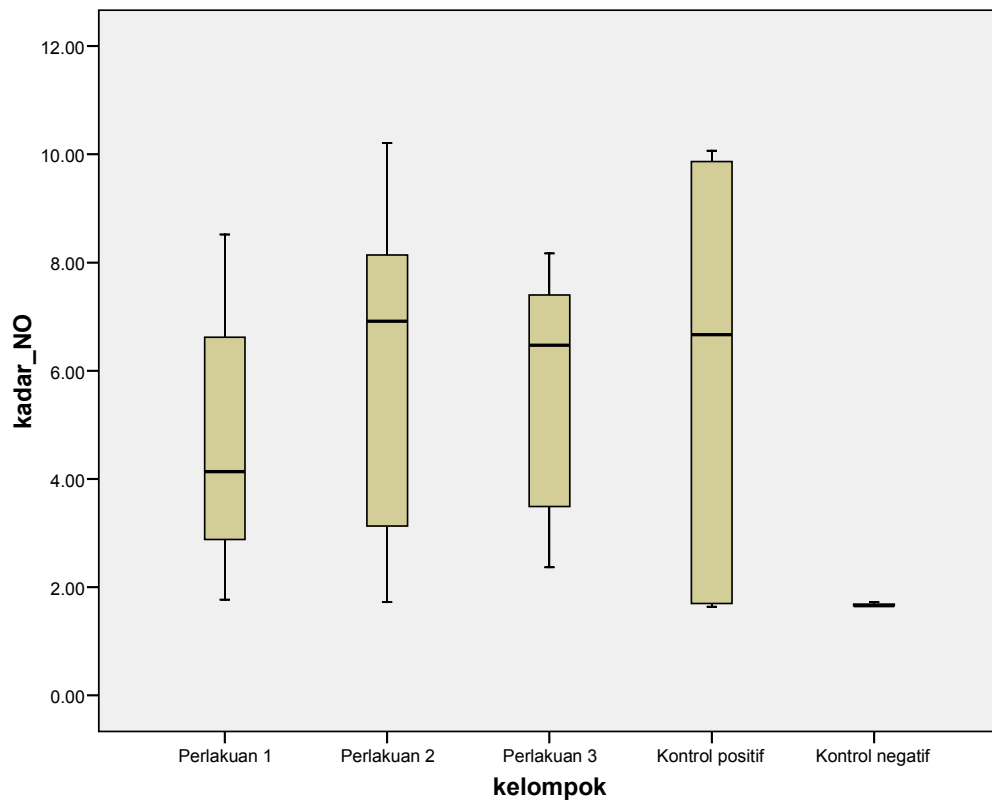
Standarisasi bahan (teh rosela) yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro Semarang. Hasil analisis teh rosela berupa kadar polifenol total. Teh rosela yang dianalisis dibuat menggunakan prosedur yang sesuai dengan yang dilakukan peneliti untuk digunakan pada perlakuan. Total polifenol yang diperoleh adalah 77,291 ppm.

Hasil pemeriksaan NO dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 3.

**Tabel 1. Hasil analisis deskriptif produksi NO makrofag.**

Kelompok	N	Rerata (SB) ( $\mu\text{M}$ )
P1	6	4,6 (2,85)
P2	6	6,2 (3,59)
P3	5	5,6 (2,52)
K1	5	5,9 (4,17)
K2	5	1,7 (0,03)

Keterangan : P1= 2 x 0,24 ml/hari; P2=2 x 0,5 ml/hari; P3=2 x 0,98 ml/hari; K1=kontrol positif; K2=kontrol negatif ; SB=simpang baku.



**Gambar 3. Grafik *box plot* produksi nitrit oksida makrofag.**

Tabel 1 dan gambar 3 menunjukkan bahwa rerata produksi nitrit oksida makrofag tertinggi pada kelompok 2 x 0,5 ml per hari (P2) yaitu 6,2 (SB 3,59)  $\mu\text{M}$  dan terendah pada kelompok kontrol negatif yaitu 1,7 (SB 0,03)  $\mu\text{M}$ .

Berdasarkan uji beda disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna rerata produksi NO pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan  $p = 0,053$  dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Hasil uji Mann-Whitney antar kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil uji Mann-Whitney produksi nitrit oksida makrofag**

Kelompok		<i>p</i>
2 x 0,24 ml	2 x 0,5 ml	0,522
	2 x 0,98 ml	0,584
	Kontrol positif	0,715
	Kontrol negatif	0,006 *
2 x 0,5 ml	2 x 0,98 ml	0,855
	Kontrol positif	0,715
	Kontrol negatif	0,010 *
2 x 0,98 ml	Kontrol positif	0,917
	Kontrol negatif	0,009 *
Kontrol positif	Kontrol negatif	0,173

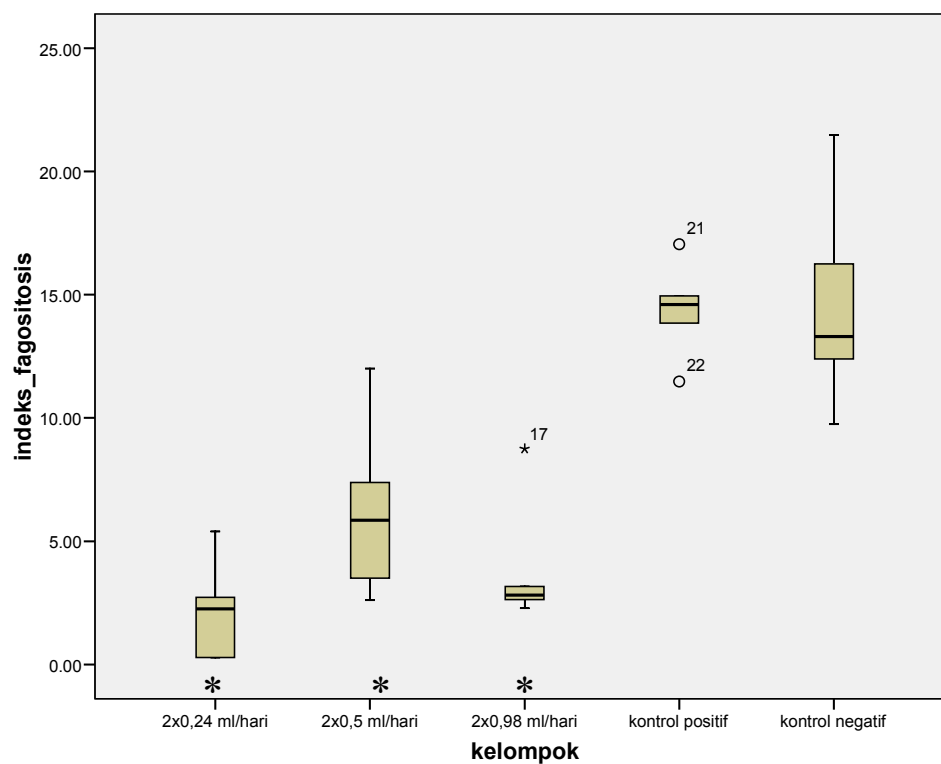
Tabel 2 menunjukkan terdapat perbedaan (lebih tinggi) bermakna pada kelompok 2 x 0,24 ml/hari, 2 x 0,5 ml/hari, 2 x 0,98 ml/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (nilai *p* berturut-turut = 0,006; 0,010; 0,009). Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dengan kontrol positif.

Kemampuan fagositosis makrofag dinyatakan sebagai indeks fagositosis. Hasil pembacaan kemampuan fagositosis disajikan pada tabel 3 dan gambar 4.

**Tabel 3. Hasil analisis deskriptif indeks fagositosis.**

Kelompok	N	Rerata (SB)
P1	6	2,2 (2,12)
P2	6	6,9 (3,16)
P3	5	3,9 (2,71)
K1	5	14,4 (2,01)
K2	5	14,6 (4,48)

Keterangan : P1= 2 x 0,24 ml/hari; P2=2 x 0,5 ml/hari; P3=2 x 0,98 ml/hari; K1=kontrol positif; K2=kontrol negatif; SB=simpang baku.



Keterangan : \* berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol positif.

**Gambar 3. Grafik *box plot* indeks fagositosis makrofag.**



Tabel 3 dan gambar 3 menunjukkan bahwa rerata indeks fagositosis tertinggi pada kelompok kontrol negatif yaitu 14,6 (SB 4,48) dan terendah pada kelompok perlakuan 2x0,24 ml/hari (P1) yaitu 2,2 (SB 2,12).

Berdasarkan uji beda disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna rerata indeks fagositosis pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan  $p= 0,001$  dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Hasil uji Mann-Whitney antar kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil uji Mann-Whitney indeks fagositosis makrofag**

Kelompok		<i>P</i>
2 x 0,24 ml	2 x 0,5 ml	0,016 *
	2 x 0,98 ml	0,143
	Kontrol positif	0,006 *
	Kontrol negatif	0,006 *
2 x 0,5 ml	2 x 0,98 ml	0,201
	Kontrol positif	0,011 *
	Kontrol negatif	0,011 *
2 x 0,98 ml	Kontrol positif	0,009 *
	Kontrol negatif	0,009 *
Kontrol positif	Kontrol negatif	0,754

Tabel 4 menunjukkan terdapat perbedaan (lebih rendah) bermakna pada kelompok 2 x 0,24 ml/hari, 2 x 0,5 ml/hari, 2 x 0,98 ml/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (nilai  $p$  berturut-turut = 0,006; 0,011; 0,009). Terdapat perbedaan (lebih rendah) bermakna pada kelompok 2 x 0,24 ml/hari, 2 x 0,5 ml/hari, 2 x 0,98 ml/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (nilai  $p$  berturut-turut =

0,006; 0,011; 0,009). Kelompok 2 x 0,24 berbeda bermakna dibandingkan kelompok 2 x 0,50 ml/hari, tetapi tidak berbeda dengan kelompok 2 x 0,98 ml/hari.

## **PEMBAHASAN**

Tanaman rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) merupakan anggota kingdom Plantae, ordo Malvales, famili Malvaceae.<sup>17</sup> Standarisasi bahan (teh rosela) yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Nutrisi, Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro Semarang. Hasil analisis teh rosela berupa kadar polifenol total. Teh rosela yang dianalisis dibuat menggunakan prosedur yang sesuai dengan yang dilakukan peneliti untuk digunakan pada perlakuan. Total polifenol yang diperoleh adalah 77,291 ppm.

Hipotesis penelitian adalah produksi nitrit oksida makrofag kelompok mencit yang diinduksi *Salmonella typhimurium* yang diberi teh kelopak rosela (kelompok perlakuan) lebih tinggi daripada kelompok yang tidak diberi teh kelopak rosela (kelompok kontrol positif). Pengaruh pemberian teh rosela diasumsikan akan memberikan hasil terbaik pada kelompok P2 (yang diberikan 1 x dosis lazim) daripada kelompok P1 (yang diberikan ½ x dosis lazim) atau P3 (yang diberikan 2 x dosis lazim).

Kenyataan yang ditemukan saat penelitian adalah produksi nitrit oksida makrofag kelompok perlakuan P2 lebih tinggi daripada P1, P3 dan kelompok kontrol positif, namun secara statistik tidak berbeda.

Perlawanan sistem imun terhadap bakteri intraseluler berupa reaksi pembunuhan bakteri intraseluler atau reaksi lisis sel yang terinfeksi bakteri intrasel. Reaksi pembunuhan bakteri intraseluler diperankan oleh makrofag dengan cara memproduksi molekul mikrobisidal intraseluler *reactive oxygen intermediates*, *nitrit oxide* (NO), *lysosomal enzymes*, sitokin TNF, IL-1, IL-12.<sup>4,5,27</sup> Produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan NO dipengaruhi oleh interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), yaitu melalui aktivasi transkripsi gen-gen yang mengkode enzim *phagocyte oxidase* yaitu enzim penghasil intermediate *reactive oxygen* dan enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS).<sup>5</sup> Polifenol dalam akar *licorice* yaitu *glycyrrhizin* dapat meningkatkan aktifitas interferon.<sup>28</sup>

Kemampuan makrofag kelompok P2 dalam memproduksi nitrit oksida adalah yang paling tinggi dibandingkan kelompok lainnya, sehingga memiliki makna bahwa kandungan polifenol pada P2 memicu reaksi pembunuhan bakteri intraseluler oleh makrofag. Polifenol teh kelopak rosela diduga dapat memacu makrofag memproduksi molekul mikrobisidal sehingga dapat mengeliminasi bakteri intraseluler.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini tidak sesuai dengan teori karena ada kemungkinan bahwa lama pemberian dan dosis teh kelopak rosela masih belum tepat.

Hasil yang berbeda ditemukan pada pengaruh polifenol teh hijau terhadap sistem imun. Polifenol teh hijau (*catechin*) dapat menghambat produksi NO sel makrofag peritoneal, produksi NO yang diinduksi LPS (lipopolisakarida), dan ekspresi gen iNOS melalui mekanisme penurunan aktivasi NF- $\kappa$ B.<sup>29</sup>

Hipotesis penelitian adalah kemampuan fagositosis makrofag kelompok mencit yang diinduksi *Salmonella typhimurium* yang diberi teh kelopak rosela (kelompok perlakuan) lebih tinggi daripada kelompok yang tidak diberi teh kelopak rosela (kelompok kontrol positif). Pengaruh pemberian teh rosela diasumsikan akan memberikan hasil terbaik pada kelompok P2 (yang diberikan 1 x dosis lazim) daripada kelompok P1 (yang diberikan ½ x dosis lazim) atau P3 (yang diberikan 2 x dosis lazim).

Kenyataan yang ditemukan saat penelitian adalah kemampuan fagositosis makrofag kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol positif.

Peranan makrofag teraktifasi dalam respon imun seluler adalah (1) memfagosit dan membunuh mikroba intrasel melalui produksi molekul mikrobisidal, (2) menstimulasi inflamasi akut lokal yang kaya akan netrofil sehingga memfagosit dan

menghancurkan organisme infeksius, dan (3) membersihkan jaringan mati akibat proses infeksi bakteri dan menginduksi reparasi jaringan.<sup>4</sup>

Flavonoid, dapat memodulasi berbagai fungsi imun, yang salah satunya adalah peningkatan sekresi IL-4 yang menghambat aktivasi makrofag, sehingga dapat menghambat respon imun seluler.<sup>5,30</sup> Polifenol dalam teh rosela yang diberikan pada kelompok perlakuan menyebabkan sekresi IL-4 meningkat sehingga menghambat aktivasi makrofag yang diinduksi IFN- $\gamma$ . Proses aktivasi makrofag menjadi terhambat yang pada akhirnya menurunkan kemampuan fagositosis makrofag.

Suatu senyawa yang awalnya memiliki sifat sebagai antioksidan apabila diberikan dalam kadar fisiologis, bisa berubah menjadi prooksidan apabila diberikan melebihi kadar fisiologisnya.<sup>31</sup> Sifat prooksidan tersebut akan mempengaruhi (merusak) integritas dan fungsionalitas lipid membran sel yang akan mengganggu proses transduksi sinyal dan ekspresi gen sel-sel imun, sehingga proses normal sel imun menjadi terganggu, termasuk makrofag.<sup>30</sup> Pada penelitian ini kemampuan fagositosis makrofag kelompok perlakuan sangat rendah dibandingkan kelompok kontrol. Makrofag pada kelompok perlakuan ternyata menerima polifenol melebihi kadar fisiologisnya, sehingga mengakibatkan gangguan fungsi makrofag, yaitu kemampuan fagositosisnya lebih rendah daripada kelompok kontrol yang tidak memperoleh teh rosela.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini tidak sesuai dengan teori karena ada kemungkinan bahwa lama pemberian dan dosis teh kelopak rosela masih belum tepat.

Hasil yang berbeda ditemukan pada pengaruh ekstrak *cat's claw* terhadap sistem imun. Ekstrak tersebut yang mengandung berbagai macam flavonoid, triterpene, mampu menstimulasi limfosit T dan aktifitas makrofag.<sup>28</sup>

Pada akhir penelitian, jumlah sampel berkurang dari 30 ekor menjadi 27 ekor mencit, karena 1 (satu) ekor mencit pada kelompok perlakuan P3 mati, 1 (satu) ekor mencit pada kelompok kontrol positif, dan 1 (satu) ekor mencit pada kelompok kontrol negatif mati. Penyebab kematian tidak ditentukan, seharusnya dilakukan analisis per-protokol dan analisis “intention to treat” untuk menentukan sebab kematian.

Kematian yang terjadi pada kelompok kontrol positif dan negatif, indeks fagositosis kelompok kontrol positif hampir sama dengan indeks fagositosis kelompok kontrol negatif, hal ini menunjukkan adanya kemungkinan kontaminasi/ infeksi selama pemeliharaan. Kenyataan tersebut mengindikasikan adanya kurang terjaganya higiene dan sanitasi untuk pemeliharaan mencit.

Ketidak sesuaian hasil penelitian dengan hipotesis disebabkan oleh belum diketahui atau belum ada penetapan dosis efektif polifenol sebagai antioksidan, karena apabila suatu senyawa yang awalnya memiliki sifat sebagai antioksidan bila diberikan pada

dosis fisiologis bisa berubah menjadi prooksidan bila diberikan melebihi dosis fisiologisnya.

Belum adanya penetapan dosis fisiologis polifenol sebagai antioksidan mungkin karena polifenol diperoleh dari berbagai macam sumber seperti buah maupun minuman yang berasal dari berbagai tumbuhan, beragamnya struktur kimia dan kompleksitas struktur kimia polifenol.<sup>32</sup>

## **SIMPULAN**

Teh kelopak rosela meningkatkan produksi nitrit oksida makrofag secara tidak bermakna. Teh kelompok rosela menghambat/ memperlemah kemampuan fagositosis makrofag.

## **SARAN**

Perlu dilakukan penelitian lanjut untuk melengkapai konsep dalam pemikiran penelitian ini antara lain : Penentuan dosis efektif atau dosis tepat polifenol yang dapat meningkatkan produksi nitrit oksida makrofag; Penentuan dosis toksik polifenol yang dapat menurunkan kemampuan fagositosis makrofag; Lama pemberian teh rosela yang berbeda untuk melihat efek terhadap fungsi makrofag; Variabel lain yang dapat mempengaruhi interferon-gamma sehingga dapat memodulasi fungsi makrofag; Pengaruh teh kelopak rosela terhadap imunitas seluler;

Pengaruh teh kelopak rosela terhadap imunitas humoral; Dilakukan penelitian yang membandingkan dengan polifenol dari sumber lain.

### **Catatan**

Penelitian ini menggunakan spesimen cairan peritoneal subjek penelitian. Cairan peritoneal diperoleh dari rongga peritoneal yang dilakukan oleh peneliti dan laboran LPPT UGM yang berpengalaman. Prosedur pengambilan cairan peritoneal mengharuskan subjek penelitian dibunuh terlebih dahulu, yaitu dilakukan dekapitasi secara dislokasi serviks.

Seluruh biaya yang berhubungan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti. Protokol penelitian telah disetujui oleh Pembimbing I, Pembimbing II, Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pascasarjana UNDIP.



## DAFTAR PUSTAKA

1. General Properties of Immune Responses. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. Cellular and Molecular Immunology. 5 ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 3-13.
2. Kaminogawa S, Nanno M. Modulation of Immune Function by Foods. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2004;1(3):241-250.
3. Pendahuluan Konsep Dasar Immunologi. In: Kresno SB, editor. Immunologi diagnosis dan prosedur laboratorium. Jakarta: Balai Penerbit FK UI; 2001. p. 1-12.
4. Effector mechanism of cell-mediated immunity. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. Cellular and molecular immunology. 5 ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 298-317.
5. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. Cellular and Molecular Immunology. 5 ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 243-74.
6. Powell J, Borchers AT, Yoshida S, Gershwin ME. Evaluation of the immune system in the nutritionally at-risk host. In: Gershwin ME, German JB, Keen CL, editors. Nutrition and Immunology Principles and practice. Totowa: Humana Press; 2003. p. 21-31.
7. Hoag KA, Nashold FE, Goverman J, Hayes CE. Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells. Journal of Nutrition 2002;132:3736-3739.
8. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R, et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profile in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. American Journal of Clinical Nutrition 2006;83:754-759.
9. Prasad AS. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. Mol Med 2008;14(5-6):353-357.
10. Haddad PS, Azar GA, Groom S, Boivin M. Natural health products, modulation of immune function and prevention of chronic diseases. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2005;2(4):513-520.
11. Chapkin RS, Arrington JL, Apanasovich TV, Carroll RJ, McMurray DN. Dietary n-3 PUFA affect TcR-mediated activation of purified murine T cells and accessory cell function in co-cultures. Clin. Exp. Immunol. 2002;130:12-18.
12. Ramiro-Puig E, Perez-Cano F, Ramirez-Santana C, Castellote C, Izquierdo-Pulido M, Permanyer J, et al. Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. Clinical and Experimental Immunology 2007;149:535-542.
13. Curran E, Judy B, Newton L, Lubahn D, Rottinghaus G, MacDonald R, et al. Dietary soy phytoestrogens and ER- $\alpha$  signalling modulate interferon gamma production in response to bacterial infection. Clin. Exp. Immunol. 2004;135:219-225.

14. Menard O, Butel M-J, Gaboriau-Routhiau V, Waligora-Dupriet A-J. Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74(3):660-666.
15. Zhai Z, Liu Y, Wu L, Senchina DS, Wurtele ES, Murphy PA, et al. Enhancement of innate and adaptive immune functions by multiple *Echinacea* species. *Journal of Med Food* 2007;10(3):423-34.
16. Lans CA. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2006;2:1-11.
17. Maryani H, Kristiana L. *Khasiat dan Manfaat Rosela*. Jakarta Selatan: AgroMedia; 2008.
18. Ali BH, Mousa HM, El-Mougy S. The effect of a water extract and anthocyanins of *hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy research* 2003;17(1):56-59.
19. Owulade MO, Eghianruwa KI, Daramola FO. Effects of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces and *Ocimum gratissimum* leaves on intestinal transit in rats. *African Journal of Biomedical Research* 2004;7:31-33.
20. Adigun M, Ogundipe O, Anetor J, Odetunde A. Dose-dependent changes in some haematological parameters during short-term administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract (Zobo) in Wistar albino rats. *African Journal of Medical Science* 2006;35(1):73-77.
21. Joshi H, Parle M. Nootropic activity of Calyces of *Hibiscus sabdariffa* Linn. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 2006;5:14-20.
22. Chart H. Salmonella. In: Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF, editors. *Medical Microbiology*. 16 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002. p. 250-259.
23. Paget G, Barnes J. Toxicity test. In: Laurence DR, Bacharach AL, editors. *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics*. London, New York: Academic press; 1964. p. 161-2.
24. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. *The laboratory mouse*. Boca Raton, London, New York, Washington DC: CRC Press; 2001.
25. Anonymus. The Jackson Laboratory Mice database. In; 2009.
26. Lwanga SK, Lemeshow S. *Sample size determination in health studies A practical manual*. Geneva: WHO; 1991.
27. Respons Imun Pada Infeksi. In: Kresno SB, editor. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. 4 ed. Jakarta: Balai Penerbit FK UI; 2001. p. 161-186.
28. Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999;70(suppl):491s-9s.
29. M. Pilar Vinardell MM. Immunomodulatory Effects of Polyphenols. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2008;7(8):3356-3362.
30. Chiao-Ming Chen S-CL, Ya-Ling Lin, Ching-Yun Hsu, Ming-Jer Shieh, Jen-Fang Liu. Consumption of purple sweet potato leaves modulates human immune response: T-lymphocyte function, lytic activity of natural killer cell and antibody production. *World J Gastroenterol* 2005;11(37):5777-5781.

31. The Fat Soluble Vitamins: A,D,E and K. In: Sharon Rady Rolfes KP, Ellie Whitney, editor. *Understanding Normal and Clinical Nutrition*. 7 ed. Belmont,CA: Thomson Wadsworth; 2006. p. 392.
32. Augustin Scalbert ITJ, Mike Saltmarsh. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81(suppl):215S-7S.