



**PENGARUH PEMBERIAN TOLAK ANGIN ANAK CAIR
TERHADAP KADAR “RADICAL OXYGEN INTERMEDIATE (ROI)”
PADA MENCIT SWISS**

*THE EFFECT OF TOLAK ANGIN ANAK CAIR ON THE LEVEL OF RADICAL OXYGEN
INTERMEDIATE (ROI) IN SWISS MICE*

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan guna mencapai derajat
sarjana strata-1 kedokteran umum**

**ANTHONY FEBRIANTO
G2A 006 021**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2010**

**PENGARUH PEMBERIAN TOLAK ANGIN ANAK CAIR
TERHADAP KADAR RADICAL OXYGEN INTERMEDIATE (ROI)
PADA MENCIT SWISS**

Anthony Febrianto¹ , Edi Dharmana²

ABSTRAK

Latar belakang: Radical Oxygen Intermediate (ROI) adalah suatu senyawa toksik yang dikeluarkan oleh makrofag untuk membunuh mikroorganisme asing yang telah di-fagositosis. Sebelumnya, pernah dilakukan penelitian terhadap Tolak Angin Cair untuk melihat bagaimana pengaruh pemberian Tolak Angin Cair ini terhadap peningkatan kadar ROI di dalam makrofag. Berdasarkan hal tersebut, maka sangat menarik untuk melihat bagaimana pengaruh pemberian Tolak Angin Anak Cair yang memiliki kandungan zat hampir serupa dengan Tolak Angin Cair tersebut terhadap kadar ROI. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adakah pengaruh dari pemberian Tolak Angin Anak Cair terhadap kadar ROI.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dan desain yang dipakai adalah *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan mencit Swiss sebagai subjek penelitian, yaitu dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan. Perlakuan dilakukan dengan pemberian Tolak Angin Anak Cair dosis bertingkat, yaitu 0,125 ml, 0,250 ml, dan 0,50 ml. Kemudian mencit dikorbankan dan diambil cairan intra-peritoneal nya untuk diperiksa kadar ROI di dalam makrofag. Data kemudian dianalisis dengan menggunakan *SPSS 15,00 for windows* dan dilakukan uji normalitas dan dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann Whitney*. Penelitian ini dijalankan mulai dari Maret sampai April 2009 dan dilakukan di Bagian Parasitologi FK UNDIP serta laboratorium CEBIOR.

Hasil: Didapatkan peningkatan signifikan antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Namun, antar sesama kelompok perlakuan, tidak didapatkan peningkatan yang signifikan ($p > 0,05$).

Simpulan: Terdapat peningkatan kadar ROI Secara signifikan ($p = 0,005$) dibandingkan dengan kontrol.

Kata Kunci: Makrofag, Radical Oxygen Intermediate

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

*THE EFFECT OF TOLAK ANGIN ANAK CAIR
ON THE LEVEL OF THE RADICAL OXYGEN INTERMEDIATE (ROI)
IN SWISS MICE*

ABSTRACT

Background: Immune system is arranged to defend from any kind of harmful substances. One of the component of the immune system is macrophage to eliminate any harmful substances in our body by doing the phagocytosis process. In order to do phagocytosis process, macrophage produce some kind of toxic chemical to kill the pathogens. One of those toxic chemical is called Radical Oxygen Intermediate (ROI). Previously, there was a research of Tolak Angin Cair to observe the reaction of ROI in macrophage. In this study, we observed the effects of Tolak Angin Anak Cair that has almost the same ingredients as Tolak Angin Cair on the level of ROI produced by Macrophage.

Methods: This research was a pure experimental research and the design used was Post Test Only Control Group Design using experimental animal as the subject of the research. The experiment used Tolak Angin Anak Cair with several doses (0,125 ml, 0,250 ml, and 0,50 ml). After that, the mice are being sacrificed and the intra-peritoneal fluid was taken to measure the level of ROI in macrophage. The next step was using the SPSS 15,00 for Windows to analyze the data followed by using the normality test. Then, using kruskal-Wallis and Mann Whitney Test to determine which data that were the significant one. This research was conducted from March until April 2009 in the Laboratorium of Parasitologi and the Laboratorium of CEBIOR.

Results: There was a significance increase in the level of ROI in the experimented mice compared to the control mice. But, if the experimented mice are compared to each other, there were not some significance increase in their level of ROI

Conclusion: There was an increase of ROI in the swiss mice that are administrated with Tolak Angin Anak Cair than the swiss mice that are only administrated with water.

Keywords: *Macrophage, Radical Oxygen Intermediate*

PENDAHULUAN

Tubuh memiliki suatu sistem imunitas tubuh yang melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen, seperti bakteri, virus, fungus, dan parasit. ¹

Beberapa upaya tubuh untuk mempertahankan diri terhadap masuknya unsur-unsur patogen diantaranya adalah :

1. menghancurkan unsur-unsur patogen dengan proses fagositosis makrofag, neutrophil
2. proliferasi dan diferensiasi limfosit sehingga menjadi sel yang mampu bereaksi dengan unsur-unsur patogen ²
3. peranan mediator-mediator yang disebut sitokin dalam mengendalikan respons imun, diantaranya adalah Interleukin (IL) dan interferon (IFN) yang diproduksi oleh sel T. ^{2,3}

pada penelitian sebelumnya telah terbukti bahwa Tolak Angin Cair dapat secara signifikan meningkatkan jumlah sel Limfosit T. ^{1,2,3}

Beberapa penelitian yang telah dilakukan pada umumnya belum secara spesifik melaporkan pengaruh langsung terhadap sistem imun. Daya antimikroba pada penelitian secara invitro terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pernah dilaporkan pada pemberian ekstrak daun pegagan. ⁶

Pada penelitian sebelumnya, pemberian Tolak Angin Cair pada manusia dewasa dapat meningkatkan kadar Interferon Gamma oleh sel T yang akan mengeluarkan Sitokin yang mempunyai efek aktivasi makrofag. Metabolit reaktif

antara lain adalah Radical Oxygen Intermediate (ROI) yang pengeluarannya dipengaruhi oleh Interferon gamma.^{4,5}

Tolak Angin Anak mengandung komponen yang sama seperti Tolak Angin Cair dengan kadar yang lebih rendah dan tambahan tanduk yang ditujukan sebagai antipiretik.^{4,5}

Dari semua data di atas, maka apabila Tolak Angin ini dikonsumsi dalam jumlah yang adekuat dapat meningkatkan kadar ROI.

Dalam hal ini, interferon Gamma yang dihasilkan oleh T-helper 1 juga dapat meningkatkan proses fagositosis yang dilakukan oleh makrofag, dan dapat diperkirakan akan terjadi peningkatan kadar ROI.^{7,8}

Berdasarkan hal tersebut diatas, sangat menarik untuk diteliti lebih lanjut mengenai Tolak Angin Anak Cair yang juga memiliki bahan-bahan serupa dengan Tolak Angin Dewasa. Dengan demikian, diharapkan akan terjadi peningkatan reaktif radikal bebas dalam makrofag tersebut.

METODE

Penelitian dilakukan di bagian parasitologi FK UNDIP pada bulan Maret sampai bulan April 2009 dan merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni serta desain yang dipakai adalah *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan hewan percobaan sebagai subjek penelitian, yaitu dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan. Perlakuan dilakukan dengan pemberian Tolak Angin Anak Cair pada kelompok perlakuan.

Perhitungan dosis Tolak Angin Anak Cair adalah sebagai berikut :

Dosis Tolak Angin Anak Cair : 3 x 10 ml (dalam sehari)

Berat badan orang dewasa : 70 kg

Berat badan anak umur 6 tahun : 22 kg

Berat badan anak umur 1 tahun : 9,4 kg

Dosis pemberian 1 bungkus (untuk anak umur 6 tahun) :

Dosis terapi pada mencit (25-35 gram) = $0,0026 \times (70\text{kg}/22\text{kg}) \times 3 \times 10 \text{ ml} = 0,25 \text{ ml}$.

Adapun prosedur penelitian ini adalah:

1. Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi coverslips bulat, setiap sumuran 200 μl (5×10^5 sel), inkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit,
2. Tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, inkubasikan selama 2 jam.
3. Sel dicuci dengan RPMI 2 x , kemudian tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, inkubasikan sampai 24 jam.

4. Makrofag peritoneum yang dikultur sehari sebelumnya, dicuci 2 x dengan RPMI.
5. Tambahkan 500 μ l larutan NBT yang mengandung PMA 125 mg/ml. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja (tanpa PMA)
6. inkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 60 menit.
7. Sel dicuci dengan PBS 3x, dikeringkan pada suhu kamar
8. Fiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik
9. Setelah kering diwarnai dg 2% larutan Neutral Red selama 15 menit, cuci dg aquadest, keringkan pada suhu kamar.
10. Coverslip dimounting pada object glass dengan Canada Balsam atau DPX
11. Sel dg reduksi NBT (biru) dihitung persentasinya dr 200 sel, dapat juga dengan scoring 1-4 atau 1-5.

Dengan adanya anion superoksida (O₂⁻) pada kultur makrofag yang diinduksi *Phorbol 15-Myristate 13-Acetate* (PMA), NBT akan teroksidasi membentuk presipitat formazan yang tidak terlarut (biru). Hasilnya dibaca dengan mikroskop cahaya, dengan menentukan prosentase dan derajat terbentuknya presipitat. Derajat presipitat didasarkan pada prosentase terbentuknya presipitat, dengan kriteria :

Derajat 1 : *presipitat <25 %*

Derajat 2 : *presipitat 25-50%*

Derajat 3 : *presipitat >50-75 %*

Derajat 4 : *presipitat >75%*

Masing-masing sediaan dibaca pada 50 sel makrofag kemudian dibuat rata-rata.

HASIL

Dengan menggunakan uji statistik deskriptif didapatkan hasil seperti berikut :

Tabel 2. Kadar ROI dalam makrofag tikus masing-masing kelompok

	dosis (ml)		Statistic	Std. Error
Air (0,250 ml)	kontrol	Mean	1,00	0,00
		Median	1,00	
		Std. Deviation	0,00	
kadar ROI	0,125 ml TAAC	Mean	1,50	0,189
		Median	1,50	
		Std. Deviation	0,535	
	0,250 ml TAAC	Mean	2,00	0,267
		Median	2,00	
		Std. Deviation	0,756	
	0,50 ml TAAC	Mean	1,80	0,133
		Median	2,00	
		Std. Deviation	0,422	

Tabel 2. menunjukkan nilai median kadar ROI pada mencit swiss kelompok kontrol adalah 1,00. Sedangkan pada kelompok perlakuan dosis 0,125 ml TAAC didapatkan nilai median meningkat menjadi 1,50. Sedangkan pada kelompok perlakuan 0,250 ml TAAC didapatkan peningkatan kembali menjadi 2,00. Namun pada kelompok perlakuan 0,50 ml TAAC didapatkan nilai 2,00 sama dengan nilai pada kelompok perlakuan 0,50 ml TAAC. Dalam hal ini, tidak terjadi peningkatan.

Uji normalitas dengan menggunakan tes *Saphiro-Wilk* dengan nilai normal $p > 0,05$ didapatkan nilai tidak normal pada kelompok perlakuan dosis 0,125 ml TAAC (0,001) dan dosis 0,50 ml TAAC (0,000). Sedangkan pada kelompok

perlakuan dosis 0,250 ml TAAC didapatkan nilai normal yaitu 0,093. Oleh karena itu, maka tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji homogenitas dan selanjutnya dilakukan analisis data dengan menggunakan tes *Kruskal-Wallis*.

Tabel 3. Hasil tes menggunakan *Kruskal-Wallis*

	ROI
Chi-Square	12.998
df	3
Asymp. Sig.	.005

Dari hasil analisis data dengan menggunakan tes *Kruskal-Wallis*, didapatkan hasil yang signifikan dengan nilai $p=0,005$ ($p<0,05$). Dari hasil tersebut, maka dilanjutkan dengan *Mann-Whitney U test* untuk mengetahui kelompok mana yang memberikan hasil signifikan tersebut.

Tabel 4. Hasil tes menggunakan *Mann Whitney*

	Kontrol	0,125 ml	0,250 ml	0,50 ml
kontrol	-	0,025	0,003	0,001
0,125 ml	0,025	-	0,165	0,192
0,250 ml	0,003	0,165	-	0,522
0,50 ml	0,001	0,192	0,522	-

Analisis dilanjutkan dengan membandingkan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 0,125 ml dan didapatkan nilai signifikan dengan nilai $p=0,025$ ($p<0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan membandingkan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 0,250 ml dan didapatkan nilai signifikan dengan nilai $p=0,003$ ($p<0,05$). Lalu dilanjutkan dengan membandingkan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 0,50 ml dan didapatkan nilai signifikan dengan nilai $p=0,001$ ($p<0,05$).

Tes kemudian dilanjutkan dengan membandingkan kelompok perlakuan dosis 0,125 ml dengan kelompok perlakuan dosis 0,250 ml dan didapatkan nilai tidak signifikan dengan nilai $p=0,165$ ($p>0,05$). Lalu dilanjutkan dengan membandingkan kelompok perlakuan dosis 0,125 ml dengan kelompok perlakuan dosis 0,50 ml dan didapatkan nilai tidak signifikan dengan nilai $p=0,192$ ($p>0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan membandingkan kelompok perlakuan dosis 0,250 ml dengan kelompok perlakuan dosis 0,50 ml dan didapatkan nilai tidak signifikan dengan nilai $p=0,522$ ($p>0,05$).

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian ini, didapatkan terjadi peningkatan bermakna kadar ROI pada mencit swiss yang dibandingkan antara kelompok kontrol (diberikan air dengan takaran 0,250 ml) dengan kelompok perlakuan (diberikan TAAC dengan dosis bertingkat).

Dengan demikian, berdasarkan dari data-data tersebut, dapat ditarik kesimpulan bahwa hipotesa sementara telah terbukti dengan adanya peningkatan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

Namun, antar sesama kelompok perlakuan, tidak didapatkan peningkatan bermakna yang telah dibuktikan dengan tes *Mann Whitney*. Pemberian TAAC dengan dosis bertingkat tidak secara langsung menunjukkan TAAC sebagai immunostimulan. Hal ini dapat dibuktikan dengan didaptkannya peningkatan tidak bermakna antar sesama dosis perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa TAAC juga mempunyai sifat imunomodulator yang dapat mengendalikan respon imun agar tidak berlebihan.

Peningkatan ini dapat disebabkan karena pemberian TAAC dapat memacu proliferasi limfoblas kemudian memacu produksi dari Interferron gamma. Interferron gamma yang terpacu ini kemudian akan memacu peningkatan jumlah makrofag yang diikuti dengan peningkatan parameter kadar toksisitas di dalam makrofag yang diukur dengan ROI dan NO.^{2,3}

Namun, peningkatan kadar makrofag juga dapat disebabkan akibat induksi secara langsung oleh TAAC. Jadi dalam hal ini, TAAC langsung dapat memacu

makrofag yang diikuti dengan peningkatan kadar ROI dan NO. Kemudian, makrofag ini nantinya juga dapat memacu pengeluaran Interferon gamma.^{2,3}

Produksi ROI oleh makrofag meningkat secara bermakna pada dosis 0.250ml/KgBB dan peningkatan dosis tidak mengakibatkan peningkatan secara bermakna antara variasi dosis yang dibuktikan oleh uji *Mann Whitney*.

Walaupun diperlukan penelitian lebih lanjut, untuk sementara dapat disimpulkan bahwa TAAC dapat meningkatkan proliferasi limfosit T yang memproduksi Interferon Gamma yang selanjutnya akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan fungsi fagositosis dalam internalisasi mikroorganisme dan fungsi *killing* dengan meningkatkan sintesa ROI^{2,3}.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka sangat menarik untuk dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh peningkatan derajat ROI terhadap fungsi protektif di dalam tubuh.

Pada penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian Tolak Angin Anak Cair sesuai dengan dosis yang dianjurkan (0,250 ml) dan berlanjut selama 1 minggu, akan dapat meningkatkan imunitas yang diukur dengan kadar Radical Oxygen Intermediate (ROI) pada mencit swiss.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur dipanjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas limpahan rahmat-Nya laporan akhir penelitian ini dapat diselesaikan. Terima kasih yang setinggi-tingginya juga ditujukan kepada kedua orang tua yang dengan dukungan penuh selalu mendorong peneliti baik dalam suka maupun duka.

Tak lupa penghargaan setinggi-tingginya peneliti haturkan kepada Prof.dr. Edi Dharmana, M.Sc,PhD, Sp.ParK sebagai pembimbing yang tidak selalu mengingatkan dan menasihati dalam rangka kesempurnaan laporan ini, serta kepada dr. Diana Nurhayati, MM, Mkes, Sp.KK dan dr. Heny Kartikawati, M.Kes, Sp.THT-KL selaku penguji. Tak lupa peneliti haturkan terima kasih kepada PT.Sidomuncul, Klepu, Semarang yang juga telah mendukung penelitian ini melalui penyediaan saran dan prasarana. Juga kepada seluruh staf Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran atas kesediaannya membantu mengurus sementara hewan percobaan penelitian dan penggunaan laboratorium nya untuk kepentingan penelitian ini. Terima kasih kami haturkan kepada seluruh staf Center for Biomedical Research (CEBIOR). Rekan-rekan satu kelompok penelitian TAAC merupakan mitra terbaik dan sangat berarti dalam menyelesaikan penelitian ini, sehingga tanpa mereka mustahil untuk menyelesaikan laporan ini tepat waktu.

Akhirnya, peneliti menyadari bahwa penelitian dan laporan ini sangat jauh dari sempurna. Peneliti sangat terbuka dengan kritik, saran dan komentar yang membangun demi kemajuan ilmu pengetahuan bidang kedokteran.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaya K G, Rengganis I. *Imunologi Dasar*. Edisi ke 8. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2009..
2. Parslow T G, Stites D P, Terr A I. *Medical Immunology*. Tenth ed. San Fransisco: Lange Medical Book; 2003.
3. Abbas K A, Lichtmant A H, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunologi*. Sixth ed. Philadelphia: W B Saunders Company; 2007.
4. Dharmana E, Irmawati I, Tjahjono. Pengaruh Jus aloe vera terhadap Proliferasi Limfosit, Produksi reactive oxigen intermediate dan Koloni Kuman Organ Hepar Mencit balb/c yang Diinfeksi. *Jurnal Kedokteran Media Medika Indonesiana*. 2004 (28 januari 2010). Available from :
<http://www.mediamedika.net/modules.php?name=Jurnal&file=index&a1=jurnal&a2=251&sort=&restart=>
5. Teja.W.A Tanduk Rusa Meningkatkan Stamina Tubuh. *Suara Karya Online*. 23 oktober 2005 (8 February 2010). Available from :
<http://www.suarakaryaonline.com>
6. Soedibyo M. *Alam Sumber Kesehatan. Manfaat dan Kegunaan*. Jakarta: Balai Pustaka; 1998.
7. Spellberg B, Edwards J E. *Type 1 and Type 2 Immunity in Infectious Disease*. The University of Chicago press. 2001 (20 januari 2010). Available from:
<http://www.jstor.org/stable/4482418>
8. R. Oettinger, K. Drumm, M. Knorst, P. Krinyak, R. Smolarski, K. Kienast
Production of Reactive Oxygen Intermediates by Human Macrophages Exposed to Soot

Particles and Asbestos Fibers and Increase in NF-kappa B p50/p105 mRNA. Springer New York. 1999 (10 januari 2010). Available from:

<http://www.springerlink.com/content/nllvep4b15muvanr/>

9. A. Saito , I. Igarashi, K. Miyahara, C. Venturini, F. G. Claveria, T. Hirose, N. Suzuki and K. Ono Effects of reactive oxygen intermediate scavengers on the antitoxoplasmic activity of activated macrophages. Springer Berlin. 2005 (10 januari 2010). Available from: <http://www.springerlink.com/content/lr207u5w4018317q/>

10. Wijayanti M A. Sekresi **reactive oxygen** intermediates oleh makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi selama infeksi Plasmodium berghei. Berkala Ilmu Kedokteran, Vol 32, No 2. 2000 (10 januari 2010). Available from:
<http://ojs.lib.unair.ac.id/index.php/bik/article/view/1177>

11. Delledonne M, Zeiert J, Marocco A, Lambt C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. PNAS. 2001 (10 januari 2010). Available from:
<http://www.pnas.org/content/98/23/13454.abstrac>

12. **Nidhi Nigam, Kulpreet Bhui, Sahdeo Prasad, Jasmine George and Yogeshwer Shukla.** [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. ScienceDirect. 27 Mei 2009 (17 Agustus 2010). Available from:
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T56-4WCTWV23&_user=10&_coverDate=09%2F14%2F2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1432725794&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=748ebfa2364f5db98a5452634b69049e