



**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA TERHADAP KEMAMPUAN
PRODUKSI NO MAKROFAG MENCIT BALB/C YANG MENDAPAT DIET
OMEGA -3 DAN DIINFEKSI *Listeria monocytogenes***

ARTIKEL PENELITIAN

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

Oleh:

ASMIRANI SUDIN

G2A004031

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2008

THE EFFECT OF ECHINACEA ADMINISTRATION TO MACROPHAGE NO PRODUCTION ABILITY ON BALB/C MICE WITH OMEGA-3 DIET AND *Listeria monocytogenes* INFECTION.

Asmirani Sudin¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRACT

Background: Omega-3 may cause immunity impairment especially in cellular immunity responses, while echinacea may increase the response.

Objective: The purpose of this study was to see the effects of Echinacea administration by measuring the concentration of NO (Nitric Oxide) produced by macrophage on BALB/C mice with Omega-3 diet.

Method and Subject: This study was a laboratory experimental study using the Post Test Only Control Group Design. 24 male BALB/C mice were divided into four groups randomly. The K Group were given standard diet, the O Group were given Omega -3 fish oil diet, the E Group were given echinacea extract, and the OE Group were given combination of Omega -3 fish oil diet and echinacea extract. On the 28th day, the samples were injected intravenously with *Listeria Monocytogenes*. The difference among the four groups were analyzed with One Way ANOVA and the difference between groups was analyzed further by Post Hoc Test Bonferron. The analysis were significant with the value $p < 0,05$.

Result: There were significant differences in concentration of macrophage NO production among the experimental groups ($p < 0,05$). The lowest concentration of NO production was found in the O group and it defined significant differences compared to the other groups. The OE Group also revealed significant differences with other groups.

Conclusion: There were significant differences in concentration of macrophage NO for the OE group despite the O group ($p = 0,001$). The concentration of NO macrophage production on the O group was less than the OE group.

Key Words: Echinacea, Omega-3, Nitric Oxide.

¹⁾ Undergraduate student, Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

²⁾ Lecturer, Medical Physic Department, Diponegoro University, Semarang

PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA TERHADAP KEMAMPUAN PRODUKSI NO MAKROFAG MENCIT BALB/C YANG MENDAPAT DIET OMEGA-3 DAN DIINFEKSI *Listeria monocytogenes*

Asmirani Sudin¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang: Omega-3 dapat menyebabkan gangguan respon imunitas seluler. Disisi lain dilaporkan penggunaan echinacea dapat meningkatkan respon imunitas seluler tersebut.

Tujuan: Untuk melihat efek penggunaan echinacea, dengan melakukan pengukuran konsentrasi NO (Nitric Oxide) makrofag pada mencit BALB/C yang mendapat diet omega-3.

Metode dan Bahan: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design*. Sejumlah 24 ekor mencit jantan BALB/C dibagi menjadi 4 kelompok secara random. Kelompok K hanya mendapatkan makan standar, Kelompok O mendapatkan diet minyak ikan omega-3, Kelompok E mendapatkan ekstrak echinacea, Kelompok OE mendapat diet minyak ikan omega-3 dan ekstrak echinacea. Pada hari ke-28 dilakukan injeksi *Listeria Monocytogenes* secara intravena. Perbedaan antara keempat kelompok dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan perbedaan masing-masing kelompok dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferroni*. Analisa bermakna bila dengan nilai $p < 0,05$.

Hasil: Penelitian mendapatkan adanya perbedaan yang bermakna dalam konsentrasi produksi NO makrofag antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Pada Kelompok O3 didapatkan konsentrasi produksi NO terendah dan bermakna bila dibanding dengan kelompok lainnya. Kelompok OE juga menunjukkan ada perbedaan bermakna dengan kelompok lain.

Kesimpulan: Didapatkan perbedaan bermakna dalam konsentrasi produksi NO makrofag pada kelompok OE dibandingkan dengan kelompok O ($p = 0,001$). Konsentrasi produksi NO makrofag pada kelompok O lebih rendah dibandingkan dengan kelompok OE.

Kata Kunci: Echinacea, Omega-3, *Nitric Oxide*.

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

²⁾ Staf Pengajar Bagian Fisika Medik Unifersitas Diponegoro Semarang

PENDAHULUAN

Imunitas adalah resistensi terhadap penyakit terutama penyakit infeksi. Gabungan sel, molekul, dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi disebut sistem imun. Reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul terhadap mikroba dan bahan lainnya disebut sistem imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat timbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. ¹

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) memiliki potensi aktivitas imunomodulator. Eicosapentaenoic acid (EPA) dan decosahexaenoic acid (DHA) adalah rantai panjang omega-3 PUFA, asam lemak tak jenuh yang ditemukan pada minyak ikan.² DHA terbukti dapat menghambat produksi NO makrofag pada respon terhadap IFN- γ dan TNF- α , padahal NO sangat dibutuhkan pada proses beberapa penyakit. Sehingga minyak ikan khususnya DHA sangat memegang peranan terhadap naiknya suseptibilitas terhadap penyakit.^{3,4}

Echinacea adalah tanaman obat tradisional yang tumbuh di Eropa dan Amerika. Echinacea purpurea dan polisakarida murni Echinasea memperlihatkan efek aktivitas imunostimulator pada tikus dan manusia. Echinacea mengaktifasi makrofag dan sel NK yang ditandai dengan sitokin (TNF- α , IL-1, IL-6), aktivasi fagositosis, proliferasi seluler, dan mempunyai kemampuan membunuh sel tumor, mengeliminasi bakteri dan jamur patogen in vitro. ⁵

NO berdifusi keluar dan menuju ke sel yang terinfeksi, kemudian bereaksi dengan beberapa makromolekul penting yang mempunyai inti besi-sulfur seperti aconitase, kompleks I dan II dari rantai transport elektron mitokondria, dan juga menghambat

ribonukleotida reduktase yang penting untuk sintesis DNA. Dengan demikian sintesis DNA dan proliferasi sel terhambat. Melalui mekanisme inilah makrofag dapat menghambat proliferasi yang cepat dari sel tumor dan bakteri intraseluler.⁶

Listeria monocytogenes merupakan bakteri intraseluler yang banyak digunakan dalam mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal oleh makrofag.^{7,8}

Penelitian ini berusaha menjawab apakah pemberian echinacea dapat mencegah penurunan produksi NO makrofag pada mencit yang diberi omega-3. Tujuan penelitian ini untuk menganalisa perbedaan konsentrasi produk NO makrofag pada mencit BALB/C dengan omega-3 tanpa echinacea dibanding dengan yang diberi echinacea. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi dalam penggunaan imunomodulator sebagai pencegah terjadinya penurunan imunitas seluler karena omega-3.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan hewan percobaan berupa mencit BALB/C sebagai objek penelitian. Sampel penelitian ini adalah 24 ekor mencit dengan kriteria inklusi adalah mencit jantan strain BALB/C yang diperoleh dari PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya, umur 10 minggu, berat badan 20-25 gram, tidak ada cacat secara anatomis. Mencit diadaptasikan selama 1 minggu (di Laboratorium Biokimia FK Undip) kemudian dibagi menjadi 4 kelompok secara acak. Pada Kelompok K, hanya mendapat pakan standar. Sementara Kelompok O

selain mendapatkan pakan standar juga mendapatkan diet omega-3 (Fish oil Manhaden produksi Sigma Aldrich dengan nomor katalog F8020) 5% dalam makanan sampai hari ke-28. Kelompok E selain mendapatkan pakan standar juga mendapatkan echinacea (*Echinacea anguistifolia* produksi Nature's Health, berdasarkan tabel konversi Laurence and Bacharach dosis maksimal 2,34 mg, dosis yang dipakai 2 mg) dalam makanan sampai hari ke-28. Kelompok OE selain mendapatkan pakan standar juga mendapat diet minyak ikan omega-3 dan ekstrak echinacea sampai hari ke-28. Pada hari ke-28 dilakukan injeksi immunogen *Listeria Monocytogenes* (dari Laboratorium Mikrobiologi FK Undip) secara intravena. Tiga hari kemudian mencit dibunuh untuk diperiksa konsentrasi NO makrofag.

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari keempat kelompok perlakuan tersebut dianalisis normalitasnya dengan uji normalitas *Kolmogrov-smirnov*. Karena distribusi datanya normal maka dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan pada keempat kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonfferoni*. Semua analisis data tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 15.0 for windows*. Nilai bermakna pada penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

PROSEDUR PEMERIKSAAN

Pemeriksaan dilakukan dengan mengisolasi makrofag peritoneal. Peritoneum Exudate Cells (PEC) hewan coba dengan kepadatan 10^6 sel/ml diinkubasi pada 37°C dengan kadar CO_2 5% selama 2 jam dalam plate 24 *wells*. Setelah diganti medium,

makrofag dikultur dalam inkubator suhu 37°C, dengan kadar CO₂ 5% selama 24 jam. Kemudian pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag dilakukan dengan metode Griess dengan menggunakan 96 wells microplate ELISA dasar rata. 100µl supernatan yang diperiksa dan standar NaNO₂ dipipet kedalam plate. Kemudian dicampurkan dengan 100µl reagen chromogenic dan stabilisasi. Absorbansi diukur pada 550nm menggunakan Bio Rad. Dari hasil pembacaan standar NaNO₂ dibuat kurva standar yang membentuk pola regresi linier.

HASIL PENELITIAN

Hasil pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag yang dihasilkan keempat kelompok perlakuan disajikan dalam tabel analisis data sebagai berikut. (Tabel 1).

One-Way ANOVA; p=0,001. signifikan (p<0,05).

Tabel 1. Konsentrasi Produksi NO makrofag

Kelompok	N	Maksimum	Minimum	Mean	SD
K	6	0,461	0,341	0,417	0,042
O3	6	0,335	0,316	0,327	0,009
E	6	0,581	0,470	0,531	0,047
O3E	6	0,725	0,639	0,692	0,040

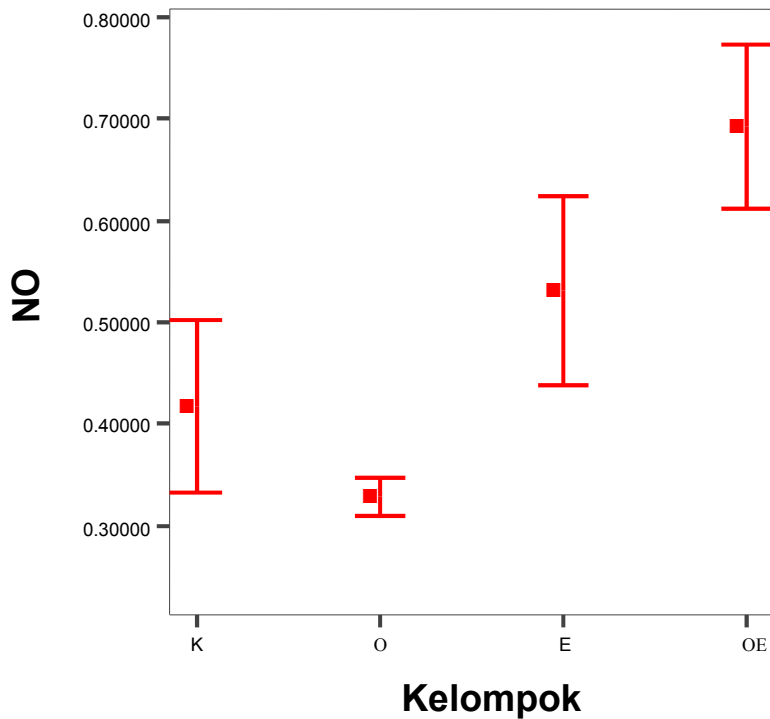
Jumlah konsentrasi produk NO makrofag paling rendah pada kelompok mencit yang mendapat omega-3 0,327 (SD 0,009) dan paling tinggi pada kelompok mencit yang mendapat Omega-3+Echinacea 0,692 (SD 0,040). Analisis statistik dengan menggunakan One Way Anova, ternyata terdapat perbedaan bermakna ($p=0,001$) pada jumlah konsentrasi produksi NO makrofag antara 4 kelompok percobaan. Karena variasinya

homogen maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan Poat Hoc Test Bonfferoni untuk melihat perbedaan antara kelompok. (Tabel 2).

Tabel 2. *Post Hoc Test Bonfferoni.*

Kelompok		<i>Mean</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>	<i>P</i>
		<i>Difference</i>			
K	O	0,089	0,025	0,153	0,003
	E	-0,115	-0,178	-0,051	0,001
	OE	-0,276	-0,339	-0,212	0,001
O	K	-0,089	-0,153	-0,025	0,003
	E	-0,204	-0,267	-0,140	0,001
	OE	-0,365	-0,428	-0,301	0,001
E	K	0,115	0,051	0,178	0,001
	O	0,204	0,140	0,267	0,001
	OE	-0,161	-0,225	-0,097	0,001
OE	K	0,276	0,212	0,339	0,001
	O	0,365	0,301	0,428	0,001
	E	0,161	0,097	0,225	0,001

Ada perbedaan bermakna antara kelompok Omega-3 dengan kelompok Omega-3+Echinacea ($p=0,001$), dimana konsentrasi NO makrofag lebih tinggi pada kelompok O3E dibanding dengan kelompok O. demikian juga ada perbedaan bermakna antara kelompok Omega-3 dengan kelompok Kontrol ($p=0,003$) dan kelompok Omega-3 dengan kelompok Echinace ($p=0,001$).



Gambar 1. Error Bars Konsentrasi NO makrofag masing-masing kelompok

PEMBAHASAN

Listeria monocytogenes merupakan bakteri intraseluler yang banyak digunakan dalam mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal oleh makrofag.⁷ Adanya *Listeria monocytogenes* dalam makrofag akan membuat makrofag memproduksi IL-2 yang akan menstimuli sel NK, membantu diferensiasi Th 0 menjadi Th 1 dan menstimulasi CD8

CTLs. Ketiga sel ini akan mensekresi IFN- γ , yang berfungsi mengaktivasi makrofag, untuk memproduksi oksigen reaktif, menstimulasi produksi antibodi dan mengopsonisasi bakteri dengan tujuan akhir membantu fungsi efektor makrofag.⁸

Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi produksi NO makrofag paling tinggi pada kelompok OE dibanding kelompok lain, ini mungkin disebabkan karena Echinacea mengaktivasi makrofag dan sel NK yang ditandai dengan sitokin (TNF- α , IL-1, IL-6), aktivasi fagositosis, proliferasi seluler, dan mempunyai kemampuan membunuh sel tumor, mengeliminasi bakteri dan jamur patogen *in vitro*.⁵ Sedangkan Omega-3 dapat meningkatkan permeabilitas sel⁹, sehingga hal ini mungkin dapat menyebabkan produksi NO yang distimulus echinacea dikeluarkan dari makrofag semakin banyak. Tapi belum ada penelitian lain mengenai interaksi echinacea dengan omega-3 secara biomolekuler.

Sedangkan pada kelompok O didapat konsentrasi NO makrofag lebih rendah dibanding kelompok lain. Hal ini mungkin dipengaruhi adanya hambatan akumulasi dan transkripsi iNOS mRNA oleh DHA yang merupakan salah satu komponen dalam minyak ikan.^{3,4} iNOS mRNA adalah enzim yang bertanggung jawab untuk produksi NO makrofag, sehingga secara tidak langsung omega-3 dapat menurunkan produksi NO makrofag.

Pada kelompok OE didapatkan konsentrasi NO makrofag lebih tinggi dibanding dengan kelompok O dan ada perbedaan bermakna. Sesuai yang diharapkan pada hipotesa penelitian, penelitian ini membuktikan bahwa Echinacea dapat menyebabkan produksi NO makrofag pada mencit BALB/C lebih tinggi dari pada Omega-3. Echinacea dapat mencegah penurunan kemampuan produksi NO makrofag pada mencit BALB/C yang diberi omega-3.

KESIMPULAN

Didapatkan perbedaan bermakna konsentrasi produksi NO makrofag pada mencit yang mendapat diet Omega-3 dan Echinacea dibandingkan dengan yang mendapat Omega-3 saja ($p=0,001$). Konsentrasi produksi NO makrofag pada kelompok Omega-3 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok Omega-3+Echinacea.

SARAN

Perlu pemeriksaan lebih lanjut untuk mengetahui:

1. Titik tangkap kerja echinacea pada produksi NO makrofag
2. Interaksi echinacea & omega-3 secara biomolekuler.

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur kepada Allah SWT sehingga terselesainya artikel ini. Terima kasih pada:

1. Staf-staf Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro,
2. LPPT Universitas Gajah Mada,
3. Bagian Biokim Universitas Diponegoro,
4. Bagian Mikrobiologi Universitas Diponegoro, dan
5. Semua pihak yang terlibat dalam proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaya KG. *Imunologi dasar*. 7th ed. Jakarta: Balai Penerbitan FKUI; 2006. p. 18-41.
2. Simopoulos, Artemis P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002; 21(6): 495-505
3. Jeyarajah DR, Kielar M, Panfield J, Lu CY. Docosahexanoic acid, a component of fish oil, inhibits nitric oxide production in vitro. *J Surg Res* 1999 May 15; 83(2): 147-50.
4. Khair-El-Din T, Sicher SC, Vasquez MA, Chung GW, Stallworth KA, Kitamura K, Miller RT, Lu CY. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexanoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oil. *J Exp Med* 1996 Mar 1; 183(3): 1241-6.

5. Rininger Joseph , Kickner Shirley, Chigurupati Padmasre, McLean Anne, Franck Zsofia. Immunopharmacological activity of echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages an human peripheral blood minonuclear cells. *Journal of Leucocyte Biology*. 2000; 68: 503-9.
6. Resno SB. *Imunologi: Diagnosa dan Prosedur Laboratorium*. Edisi 4. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2001. p.1-131.
7. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brook GF, Butel Js, Orsntor LN, Irawati S (editor). *Microbiologi kedokteran*. Edisi 20. Jakarta: EGC;1996. p. 243-5.
8. Abbas AK, Lichmant AH. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Philadlphia: Saunders; 2003. p. 275-97.
9. Hirashima Fuyuki, M.P Aimee, L.S Andrew, M.D Christina, E.D Karen, R.L Michael, G.E Justin, Zuo Chun, M.C Bruce, F.R Perry. Omega-3 Fatty Acid Treatment and T2 Whole Brain Relaxation Times in Bipolar Disorder. *Am J Psychiatry*. 2004; 161:1922-24.