

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Makrofag

Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear yang utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing lainnya. Makrofag berasal dari sel prekursor dari sumsum tulang, dari promonosit yang akan membelah menghasilkan monosit yang beredar dalam darah. Monosit yang telah meninggalkan sirkulasi darah akan mengalami perubahan-perubahan untuk kemudian menetap di jaringan sebagai makrofag (makro = besar dan phagen = makan), di dalam jaringan makrofag dapat berpoliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis lebih banyak.¹¹

Konsep kunci mekanisme efektor antibakterial makrofag teraktivasi antara lain : memproduksi NO, ROI, pembunuhan intrafagosom, asidifikasi fagosom, fusi fagosom-lisosom dan mengurangi *supply* Fe, sedangkan upaya penghindaran mikroorganisme terhadap respon imun antara lain : memproduksi molekul yang merusak ROI, antara lain : *superoksida dismutase, catalase ROI scavenger (phenolic glycolipid sulfatides, lipoarabinomannan)* menghindari fagolisosom dengan masuk ke dalam sitoplasma, membentuk dinding sel yang kuat, netralisasi fagosom dengan komponen basa, misalnya NH_4^+ , menghambat fusi fagosom dengan NH_4^+ , sulfatides, glikolipid dan menghasilkan *siderophore* (mekanisme penghindaran oleh mikroba) di samping itu salmonella mempunyai kemampuan mutasi dengan berbagai jalan antara lain menghambat aktifitas iNOS.^{11.12}

2.1.1. Mekanisme makrofag sebagai fagosit dalam membunuh kuman :

a. Proses oksidatif (*oxygen dependent mechanisms*)

Proses oksidatif yang terjadi berupa peningkatan penggunaan oksigen, peningkatan proses *hexose monophosphate shunt (HMPS)*, peningkatan produksi *hydrogen peroxide (H₂O₂)* dan produksi beberapa senyawa seperti *superoxide anion, hydroxyl radicals, singlet oxygen,*

myeloperoxidase yang dapat berinteraksi sehingga menghasilkan metabolit oksigen yang toksik sehingga dapat digunakan untuk membunuh kuman.

b. Proses non oksidatif (*oxygen independent mechanism*)

Proses non oksidatif berlangsung dengan bantuan berbagai protein seperti *hydrolytic enzyme*, *defensins (cationic protein)*, *lysozyme*, *lactoferrin* dan *nitric oxid synthase (NOS)*. Pada aktivitas *nitric oxide synthase (NOS)* diperlukan bantuan *IFN- γ* dan *TNF- α* tipe I yang dapat meningkatkan produksi NO dari makrofag di organ limfe.^{11.12}

2.1.2. Fase-fase proses fagositosis makrofag :

2.1.2.1. Kemotaksis

Kemotaksis adalah gerakan fagosit ke tempat infeksi sebagai respon terhadap berbagai faktor seperti produk bakteri dan faktor biokimia yang lepas pada aktivasi komplemen

2.1.2.2. Adhesi (partikel diselimuti opsonin)

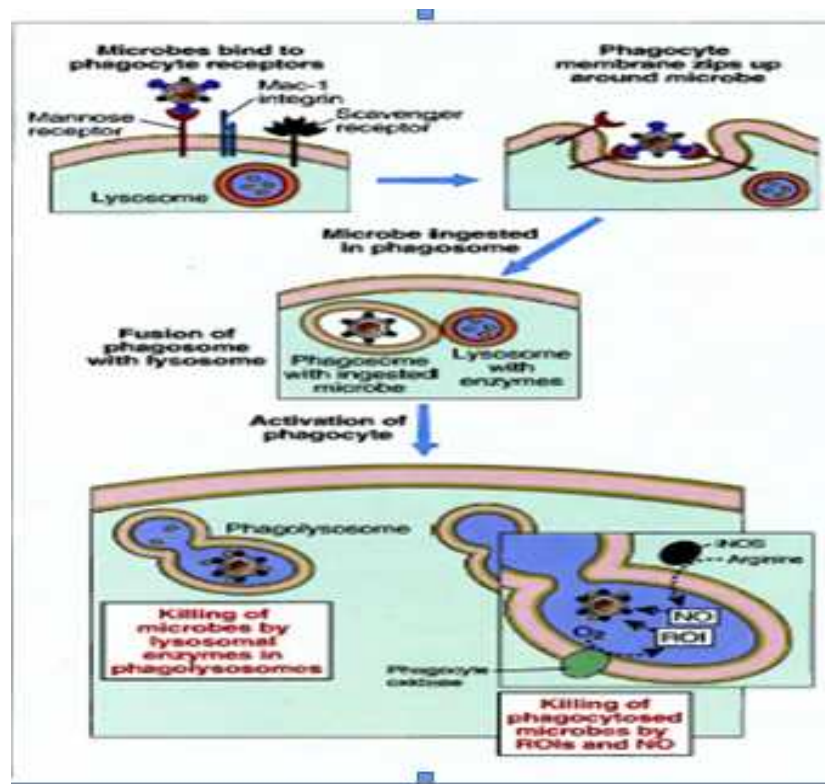
Adhesi merupakan proses perlekatan membran plasma fagosit dengan permukaan mikroorganisme atau benda asing lainnya. Makrofag bisa dengan mudah memfagosit bakteri jika mereka dilapisi terlebih dahulu dengan protein plasma tertentu yang mendukung adhesi. Proses pelapisan ini disebut opsonisasi dan proteinnya disebut opsonin yang berupa beberapa komponen sistem komplemen dan molekul antibodi

2.1.2.3. Ingesti (penelanan)

Proses penelanan bakteri terjadi karena fagosit membentuk tonjolan pseudopodi pada membran plasmanya, kemudian membentuk kantung yang mengelilingi bakteri pada saat dimakan. Bakteri kemudian akan terkurung dalam kantung yang disebut fagosom (vakuola fagositik). Dinding fagosom dengan demikian terdiri dari dinding bagian luar fagosit.

2.1.2.4. Degranulasi

Pada saat fagosom masuk ke sitoplasma, maka akan mengalami fusi dengan lisosom dan membentuk fagolisosom, sehingga terjadi pembunuhan mikroba oleh enzim lisosom pada fagolisosom dan terjadi pembunuhan oleh ROS dan NO. Dalam beberapa detik setelah terjadinya fusi akan berlangsung degranulasi dan pembunuhan (*killing*) NADPH oksidase mengubah NADPH menjadi NADP. Oksidasi ini membangkitkan H₂O₂. H₂O₂ kurang kuat dalam membunuh mikroba dan membutuhkan enzim myeloperoksidase (MPO) yang terdapat pada *azurophilic granule* dari neutrofil yang mengubah H₂O₂ menjadi hipoklorit (HOCL). Hipoklorit merupakan zat antimikroba yang kuat yang merusak mikroba dengan halogenasi atau dengan oksidasi protein dan lipid peroksidase.¹¹⁻¹³



Gambar 1. Fagositosis dan penghancuran mikroba intraseler.

(diambil dari Abbas AK, Lichman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia :WB Saunders Co.1997)¹¹

2.1.3. Makrofag teraktivasi

Proses pengaktifan makrofag bukan merupakan proses tunggal. Pengukuran untuk makrofag teraktivasi dapat dilakukan antara lain kemampuan killing terhadap mikroba yang sudah difagositosis. Aktivasi makrofag diakibatkan adanya peningkatan transkripsi gen-gen, karena adanya peningkatan ekspresi gen-gen tersebut maka makrofag dapat melakukan fungsi yang tidak dapat dilakukan oleh sel yang sama dalam keadaan istirahat. Sitokin aktivator makrofag yang poten adalah IFN- γ .¹⁴ Makrofag teraktivasi mempunyai beberapa ciri antara lain :

a. Kemampuan *killing*nya meningkat terhadap mikroorganisme

Killing terhadap bakteri menyangkut proses fagositosis dan pembentukan ROS. Sitokin seperti IFN- γ akan meningkatkan baik endositosis maupun fagositosis oleh monosit. Fagositosis terhadap partikel tertentu dapat ditingkatkan dengan opsonisasi bakteri yaitu dengan melapisi bakteri dengan molekul IgG atau komplemen. IFN- γ menyebabkan peningkatan ekspresi reseptor dengan ikatan kuat terhadap bagian Fc dari IgG. Bakteri setelah masuk ke dalam makrofag maka akan dilakukan pembunuhan dengan ROS melalui jalur ROI. Radikal superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan *singlet oxygen* termasuk golongan ROS. ROS sangat reaktif maka dapat membunuh bakteri dan menghancurkan sel-selnya. Dalam proses tersebut dibutuhkan lebih banyak oksigen (kebutuhan oksigen meningkat sampai 100 kali) maka prosesnya disebut sebagai

respiratory burst (letupan respiratori). *Nitric oxide synthase* berikatan dengan molekul kofaktor tetrahidrobiopterin, ikatan NOS dan kofaktor ini akan mengubah L-arginin dengan bantuan oksigen untuk membentuk sitrulin dan NO. NO ini bersifat toksik untuk bakteri.²⁶ Jalur ini diaktivasi oleh IFN- γ dan dipicu oleh adanya TNF.¹⁴

- b. Makrofag teraktivasi akan memacu inflamasi dengan mengeluarkan mediator-mediator inflamasi

Platelet activating factor (PAF), prostaglandin dan leukotrien adalah lipid, beberapa disintesis oleh makrofag sendiri dan yang lainnya dihasilkan dari molekul-molekul plasma sebagai tanggapan atas enzim dan molekul-molekul terkait yang dihasilkan oleh makrofag. Sebagai contoh makrofag dapat menghasilkan *tissue factor* yang dapat menginisiasi *clotting cascade* ekstrinsik. Trombin sebagai protease darah yang teraktivasi selama *clotting cascade* akan menyebabkan neutrofil dan sel endotel mensintesis PAF. Pemberian IFN- γ akan meningkatkan kapasitas biosintesis makrofag untuk membentuk mediator semacam *tissue factor*, akibat mediator-mediator yang dilepaskan maka terjadilah inflamasi lokal.¹⁴

2.1.4. Sitokin yang diproduksi makrofag

Beberapa sitokin yang berperan dalam fungsi efektor dan dihasilkan makrofag, antara lain adalah:¹⁵⁻¹⁷

a. *Tumor necrosis factor (TNF)*

Merupakan mediator utama pada respons terhadap bakteri gram negatif dan berbagai mikroorganisme penyebab infeksi. Makrofag merupakan

sumber utama TNF. TNF memiliki efek biologis sebagai berikut: 1). Pengerahan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk menyingkirkan mikroba. 2) Memacu ekspresi molekul adhesi sel vaskular untuk leukosit. 3) Merangsang makrofag mensekresi kemokin dan menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit. 4) Menginduksi apoptosis sel inflamasi yang sama.

b. IL-1

Fungsi utama IL-1 adalah sama dengan TNF, yaitu mediator inflamasi yang merupakan respon terhadap infeksi dan rangsangan lain. Bersama TNF berperan dalam imunitas nonspesifik. Sumber utama IL-1 juga sama dengan TNF yaitu fagosit mononuklear yang diaktifkan.

c. IL-6

IL-6 berfungsi dalam imunitas nonspesifik dan spesifik. IL-6 ini diproduksi fagosit *mononuclear*, sel endotel vaskuler, fibroblas dan sel lain sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lain. Dalam imunitas nonspesifik, IL-6 merangsang hepatosit untuk memproduksi *acute phase protein* (APP) dan bersama CSF merangsang progenitor di sumsum tulang untuk memproduksi neutrofil. Dalam imunitas spesifik, IL-6 merangsang pertumbuhan dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi.

d. IL-12

IL-12 merupakan mediator utama imunitas nonspesifik dini terhadap mikroba intraseluler dan merupakan induktor kunci dalam imunitas seluler spesifik terhadap mikroba. Sumber utama IL-12 adalah fagosit mononuklear dan sel dendritik yang diaktifkan. Efek biologis IL-12 adalah 1) menyebabkan sel NK dan sel T mensekresi IFN. 2) bertindak sebagai faktor diferensiasi sel T. 3) meningkatkan fungsi sitolitik sel NK dan sel T CD 8 teraktivasi.

2.1.5. Sitokin yang mempengaruhi aktivasi makrofag.¹⁸⁻²¹

a. IFN – γ

IFN- γ merangsang ekspresi MHC-I dan MHC-II dan kostimulator APC. IFN bekerja terhadap sel B dalam pengalihan *subclass* IgG yang mengaktifkan Fcy-R pada fagosit dan mengaktifkan komplemen. Kedua proses ini meningkatkan fagositosis mikroba yang diopsonisasi. Fungsi utama IFN dalam hubungannya dengan fungsi makrofag adalah sebagai aktivator poten untuk fagosit mononuklear. IFN juga meningkatkan reseptor untuk IgG (FcyRI) pada permukaan makrofag.

b. IL-10

IL-10 merupakan inhibitor makrofag dan sel dendritik yang berperan dalam mengontrol reaksi imun non spesifik dan imun seluler. IL-10 diproduksi terutama oleh makrofag yang diaktifkan. Fungsi utama IL-10 adalah menghambat produksi beberapa sitokin (TNF, IL-1, kemokin, dan IL-12) dan menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul MHC kelas II pada makrofag. Dampak akhir dari aktivasi IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi nonspesifik maupun spesifik yang diperantai sel T.¹⁸⁻²¹

2.2. *Nitric oxide*

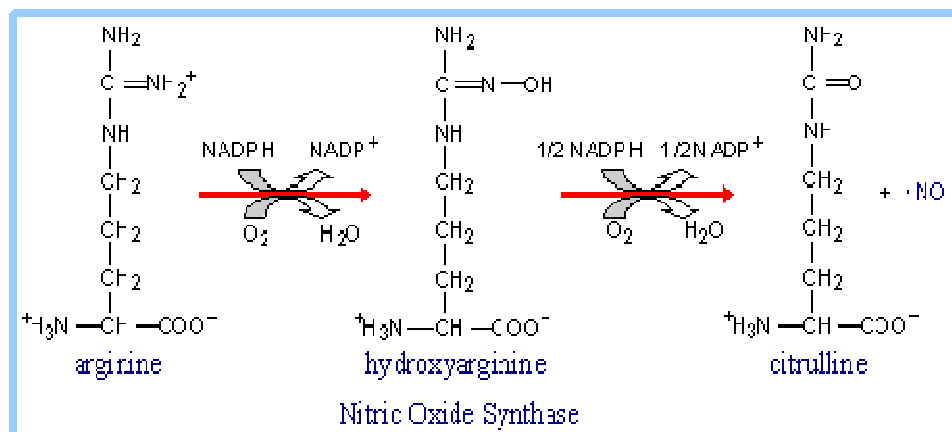
2.2.1. Pembentukan *nitric oxide*

Nitric oxide adalah produk yang dihasilkan oleh makrofag teraktivasi untuk pembunuhan patogen intrasel melalui jalur RNI. NO merupakan suatu radikal bebas yang disintesis oleh enzim NOS melalui reaksi yang kompleks. Proses produksi *nitric oxide* diawali dari terpajan makrofag oleh lipopolisakarida (LPS) dari bakteri sehingga jalur produksi

reactive nitrogen intermediate (RNI) terinduksi. Jalur produksi RNI dimulai dari proses perubahan L – arginin menjadi L – citrulin yang membutuhkan *flavin adenine dinucleotidase (FAD)*, *flavin mononucleotidase (FMN)*, NADP yang terinduksi (NADPH) dan bentuk tereduksi dari biopretin (BH₄) dengan bantuan enzim *nitric oxide synthase (NOS)*. Proses ini menghasilkan molekul NO yang dapat teroksidasi menjadi senyawa RNI seperti *dinitrogen trioxide (N₂O₃)* dan *dinitrogen tetraoxide (N₂O₄)*. RNI akan berperan pada fase awal dan berikutnya pada aktifitas antibakteri makrofag. *Nitric oxide*, nitrit dan nitrat termasuk dalam kelompok RNI. Makrofag menciit yang teraktifasi oleh sitokin IFN, TNF, IL -1, IL-2 dan lipid A dari lipopolisakarida (LPS) bakteri dengan bantuan iNOS akan terinduksi untuk membentuk NO dari prekursor L-arginin.²²⁻²³

NADPH oksidase dan iNOS dapat bersinergi membentuk molekul antimikroba yang potensial. NO dan O₂⁻ dapat bereaksi membentuk ONOO⁻ (peroksinitrit), suatu oksidan yang dapat meningkatkan daya bunuh terhadap salmonella. NADPH oksidase mengkatalisis molekul O₂ menjadi O₂⁻ (superoksida) yang dapat dimetabolisir menjadi ROI seperti H₂O₂ yang sangat toksik, iNOS mengkatalisis L- arginin menjadi sitrulin dan NO yang selanjutnya dapat dimetabolisir menjadi *reactive nitrogen intermediates (RNI)*.²⁴ NOS terdiri dari tiga bentuk isoform yang dibedakan atas pola ekspresi dan kebutuhan kalsium yaitu : *neural nitric oxide synthase (nNOS)*, *endothelial nitric oxid synthase (eNOS)* and *inducible nitric oxide synthase (iNOS)*. *nNOS* dan *eNOS* diatur oleh suatu kompleks kalsium / *calmodulin*, sedangkan *iNOS* merupakan suatu enzim Ca⁺² *independents*. Bentuk isoform utama yang diekspresikan dalam makrofag adalah *NOS₂*, dikenal sebagai *iNOS* yang menginduksi ekspresi NO, isoform tersebut mengaktifkan kalsium pada *resting cell* dan mengontrol produksi NO, sedangkan ekspresi *iNOS* diatur oleh kalium dan sintesis NO makrofag.²⁵⁻²⁷

NOS akan berikatan dengan molekul kofaktor tetrahidrobiopterin dan dengan bantuan O_2 , ikatan NOS dan kofaktor ini akan mengubah L-arginin menjadi sitrulin dan NO. NO mempunyai antimikroba yang penting terhadap salmonella. Respon imun Th1 yang didominasi oleh IFN, TNF dan IL – 12 bersama NO merupakan efektor terhadap *Salmonella typhimurium*. Hasil autooksidasi NO seperti NO_2 , N_2O_3 dan s-nitrosotiol juga akan meningkatkan potensi sitotoksitas. Selain reaksi tersebut diatas, sinergi ROI dengan RNI dapat membentuk spesies antimikroba yang lebih toksik, misalnya NO bereaksi dengan *singlet oxygen* membentuk peroksinitri ($ONOO^-$) suatu oksidan yang dapat merusak lipid, protein dan DNA bakteri. Peroksinitrit ini dapat meningkatkan daya bunuh makrofag terhadap salmonella.²⁸⁻³⁰



Gambar 2. Reaksi pembentukan citrulin dan NO

(diambil dari : Alderton WK, Nitric Oxide synthase : structure, function and inhibition, England. 2001)

2.3. *Salmonella typhimurium*

2.3.1. Aspek bakteriologi

Salmonella typhimurium adalah kuman berbentuk batang, gram negatif, fakultatif anaerob serta fakultatif intraseluler yang secara khas meragikan glukosa dan manosa, tidak meragikan laktosa dan sukrosa. Kuman ini sering bersifat patogen pada manusia dan binatang bila masuk

melalui mulut. Termasuk ke dalam kelompok *enterobacteriaceae* dan secara signifikan menyebabkan penyakit enterik^{2,4,31}

Infeksi *Salmonella enterica* (serovar typhimurium) menimbulkan beberapa penyakit antara lain : *acute intestinal inflammation* dengan manifestasi klinik diare dan *vomiting*, selain itu memicu diseminasi mikroba dan infeksi serius. Salah satu karakter virulensi salmonella adalah mampu menginvasi sel-sel epitel intestinal, kemudian menembus *barrier* epitel, makrofag dan *Peyer's patches*^{3,32,33}

2.3.2. Patogenesis penyakit

Salmonella typhimurium yang masuk ke dalam saluran cerna akan menembus epitel ileosekal dan bermultiplikasi dalam folikel limfoid intestinal, kemudian mengikuti aliran limfe memasuki sirkulasi darah menuju organ RES terutama hepar dan limpa serta organ lain, sehingga akan menyebabkan perubahan histopatologik organ-organ tersebut. Kemungkinan kedua adalah bakteri mencapai sirkulasi karena terbawa makrofag yang terinfeksi. *Salmonella typhimurium* memasuki epitel ileum dengan cara invaginasi pada mikrovili yang akan membesar dan menyatu bersamaan dengan masuknya bakteri tersebut melalui *brush border*. *Salmonella typhimurium* dapat merusak permukaan penghubung yang menyatukan sel epitel dan melakukan penetrasi pada *barrier* epitel melalui radang interaseluler. Pada plak Peyeri terjadi pembengkakan berwarna merah muda di akhir minggu I, namun permukaan mukosa tetap utuh. Kelenjar limfe mesenterium juga membesar dan terdapat area nekrotik serta hemoragik. Pada akhir minggu III dasar ulkus meluas sampai lapisan otot, permukaan usus tertutup serosa dan bisa menjadi peritonitis fibrosa.^{16,34,35,36}

Respons imun terhadap *Salmonella typhimurium* meliputi sistem imun natural (*innate*) dan sistem imun adaptif (*acquired*). Sistem imun natural berfungsi untuk mengidentifikasi dan melawan mikroba serta penanda imun adaptif. Respons imun natural dimulai dengan pengenalan komponen bakteri seperti LPS dan DNA, diikuti pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi *host* terhadap infeksi. Peran ini dilakukan oleh makrofag, sel NK, dan neutrofil. Adapun pengeluaran mediator inflamasi berfungsi untuk memperkuat respons imun makrofag mensekresi IL-1, IL-6, IL -8, IL-12, IL-15, IL -18 dan TNF alfa. Interleukin -1, IL-6, dan TNF alfa bekerja sinergis untuk meningkatkan aktivasi sel T dan respons radang akut. Interleukin-8 membantu menarik neutrofil ke tempat infeksi. Interleukin -12 mengaktivasi sel NK dan memicu diferensiasi CD4⁺ menjadi Th1. Interleukin -12 juga meningkatkan kemampuan bakterisidal fagosit, meningkatkan IFN γ , dan meningkatkan sintesis NO. Interleukin -15 penting untuk respons inflamasi, fungsi antimikrobal neutrofil, stimulasi CD8⁺ serta perkembangan, *survival*, dan fungsi sel NK. Interleukin -18 menginduksi IFN γ , ko-aktivasi Th1, dan perkembangan sel NK. Makrofag juga mengeluarkan ROI dan RNI yang dapat meningkatkan mekanisme membunuh bakteri. Makrofag mampu menghancurkan bakteri dengan *respiratory burst* yang menghasilkan *reactive oxygen species (ROS)* seperti superoksida, hidrogen peroksidase dan NO^{16.34.37.38}

Nitric oxide diproduksi bersama dengan L-sitrulin melalui oksidasi enzimatis dari L-arginin. Produksi NO distimulasi oleh IFN γ , TNF alfa, IL-1 dan IL-2. Nitrit oksida merupakan implikasi respons terhadap bakteri intraseluler seperti *Salmonella* yang tercermin dengan melimpahnya NO di bagian luar fagosom. Antara ROI dan NO dapat berinteraksi dengan membentuk spesies antimikroba yang lebih toksik seperti peroksi-nitrit yang dapat meningkatkan daya bunuh makrofag terhadap *Salmonella*.^{22.23.39.40}

2.3.3. Manifestasi klinik

Infeksi *Salmonella typhimurium* dapat terjadi dalam tiga kesatuan gejala klinik yang berbeda, terbatas pada gastrointestinal, septikemia dengan lesi fokal atau demam enterik misalnya demam tifoid. Gastrointestinal *S.typhimurium* merupakan infeksi yang hanya terjadi pada kolon dan biasanya terjadi setelah 18-24 jam penelanan bakteri. Penyakit ini ditandai dengan diare, demam dan sakit perut. Hal ini biasanya terjadi sekitar 2 – 5 hari, sebagian kasus tidak memperlihatkan sakit. Dehidrasi dan ketidakseimbangan elektrolit merupakan ancaman dalam meluasnya kasus ini. *Septikemia S.typhimurium* ditandai dengan demam, anoreksia, kedinginan dan anemia. Lesi fokal dapat berkembang dalam sejumlah jaringan, menghasilkan osteomielitis sekunder, pneumonia, abses paru meningitis dan endokarditis. Gastroenteritis jarang, bahkan tidak ada.^{4.5.18.19.42.43}

2.3.4. Tanda dan gejala klinis mencit yang terinfeksi *S. typhimurium*

Tanda dan gejala klinis mencit yang telah terinfeksi *S. typhimurium* antara lain mencret, berat badan turun, lemah, bulu kasar.

Salmonellosis pada mencit dapat didiagnosis dengan isolasi dan identifikasi organisme dari tinja, darah, hati dan limpa. Pemeriksaan pasca mati menunjukkan radang pada selaput lendir usus kecil. Organisme mencapai hati melalui vena porta, terjadi nekrosis sel-sel hati berbentuk pulau-pulau dan proliferasi makrofag. Limpa membesar, penuh dengan darah dan disertai nekrosis fokal. Hati membesar, berwarna coklat sampai kuning kecoklat-coklatan, rapuh dan mudah pecah.^{4.5.18.19}

2. 4. Peran fagositosis makrofag dan NO pada infeksi *Salmonella typhimurium*

Bakteri intraselular fakultatif dapat hidup bahkan berkembangbiak dalam fagosit, karena mikroba ini menemukan tempat untuk bersembunyi sehingga tidak terjangkau oleh antibodi dalam sirkulasi, maka untuk menyingkirkannya diperlukan mekanisme respon imun yang berbeda dengan respon imun terhadap mikroba ekstraseluler. Bakteri berusaha mencegah proses pembunuhan intraseluler dengan menghambat penggabungan (fusi) lisosom dengan vakuola yang berisi mikroba, menghambat fagositosis dan pembentukan ROI atau menghambat terjadinya *respiratory (oxidative) burst*.^{18.19.44.46}

Salmonella jika masuk ke tubuh inang maka respon imun yang pertama adalah respon imun alami (*innate immunity*) di mana yang berperan adalah fagosit dan sel natural killer (NK). Fagosit diawali oleh neutrofil dan makrofag yang menyerang dan menghancurkan mikroba tersebut. Peranan fagosit dalam respon imun alami terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom fagosit. Selanjutnya respon imun spesifik akan teraktivasi oleh antigen *Salmonella*.

Pada fase ini limfosit T akan mengaktifasi makrofag, sel NK dan sel sitolitik untuk menghancurkan bakteri. Antigen bakteri ini mengaktifasi sel NK secara langsung atau melalui stimulasi oleh IL-12 yang diproduksi makrofag. Sel NK juga akan memproduksi IFN- γ yang akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan degradasi bakteri yang difagosit.^{18,19,47}

Bakteri intraseluler juga akan menstimulasi makrofag untuk memproduksi IL-12 yang akan mengaktifasi sel NK, menstimulasi perkembangan sel Th1 dan mengaktifkan sel T CD8⁺ (CTLs). Ketiga sel yang teraktifkan ini akan mensekresi IFN- γ yang akan mengaktifkan makrofag dan makrofag tersebut akan memproduksi beberapa substansi *microbicidal*, terdiri dari *reactive oxygen intermediates (ROI)*, NO dan enzim lisosom. IFN- γ juga menstimulasi produksi dari antibodi, yang mengaktifkan komplemen dan opsonin bakteri untuk difagositosis, yang membantu fungsi efektor makrofag. Kemampuan makrofag membunuh bakteri tergantung pada senyawa *oxygen dependent (hydrogen peroxide, single oxygen)* dan senyawa *oxygen independent (lisosme, lactoferin, cationic protein)*.⁴⁸

Bakteri masuk ke dalam fagosom, menyatu dengan lisosom membentuk fagolisosom. Disini terjadi 2 proses yaitu : *respiratory burst* dan digesti oleh enzim lisosom. *Respiratory burst* dimulai dari perubahan O₂ menjadi O₂⁻ oleh NADPH oksidase. dalam reaksi yang dikatalis oleh superoksida dismutase (SOD), dua molekul H⁺ dan O₂⁻ akan membentuk H₂O₂. Enzim lisosom bertugas mencerna fragmen-fragmennya, setelah sel bakteri mengalami disintegrasi. Daya bunuh makrofag dengan ROI merupakan aktifitas antimikroba yang dilakukan beberapa jam sesudah fagositosis. *Respiratory burst* mempunyai peran yang sangat esensial dalam membunuh salmonella yang virulen.⁴⁸⁻⁴⁹

2.5. Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)

2.5.1. Taksonomi

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Ordo	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae
Genus	: <i>Syzygium</i>
Species	: <i>Syzygium polyanthum</i> (Wight) Walp. ^{6.7.50}



Gambar 4. Daun salam

2.5.2. Kandungan kimia

Kandungan daun salam antara lain : minyak atsiri, tanin dan flavonoid.

Komponen-komponen aktif dalam daun salam (*Syzygium polyanthum*)

a) Minyak atsiri

Mekanisme toksisitas fenol dalam minyak atsiri menyebabkan denaturasi protein pada dinding sel kuman dengan membentuk struktur tersier protein dengan ikatan non spesifik atau ikatan disulfida.

b) Tanin

Salah satu aksi molekul tanin adalah membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan non spesifik seperti ikatan hidrogen dan efek hidrofobik sebagaimana pembentukan ikatan kovalen. Cara kerja anti

mikroba mungkin juga berhubungan dengan kemampuan tanin untuk menginaktivasi adhesin mikroba (molekul untuk menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel, enzim yang terikat pada membran sel, protein transpor *cell envelope*. Tanin juga membentuk kompleks dengan polisakarida.

c) Flavonoid

Senyawa ini berfungsi antara lain sebagai anti inflamasi, dan antioksidan. Flavonoid yang bersifat lipofilik membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dengan dinding sel kuman, serta merusak membran sel kuman^{6,7,50}

2.5.3. Efek farmakologi daun salam

Pemberian ekstrak daun salam dengan dosis 56,7 mg/kg BB dapat meningkatkan produksi NO pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*⁵⁰

Gambar 2. Pembentukan NO melalui jalur RNI. ²⁶

c. Makroafg teraktivasi akan meningkat efisiensi sebagai sel APC

Peningkatan kapasitas presentasi antigen berhubungan dengan ekspresi molekul MHC II pada permukaannya. IFN- γ sebagai aktivator untuk transkripsi gen-gen MHC kelas II tetapi di makrofag Granulocyte makrofag colony stimulating factor (GM-CSF) juga mempunyai effect serupa. Makrofag teraktivasi menghasilkan sitokin seperti IL-12 atau IFN- γ yang memacu diferensiasi limfosit

