

1771 4101/2004  
SALMELLA

KK  
740.35/39  
2004

TESIS

**EFEK IMUNOMODULATOR PROPOLIS PADA FAGOSITOSIS  
INTRASELULER *Salmonella typhi* DARI MAKROFAG PERITONEAL  
MENCIT**



**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**DWI KRIHARIYANI**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

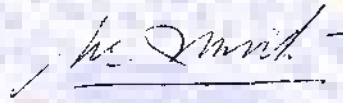
**2004**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 27 Agustus 2004

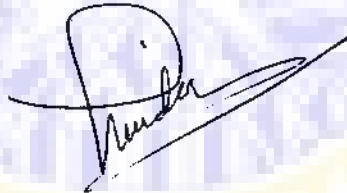
Oleh

Pembimbing Ketua



Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK  
NIP.130 676 011

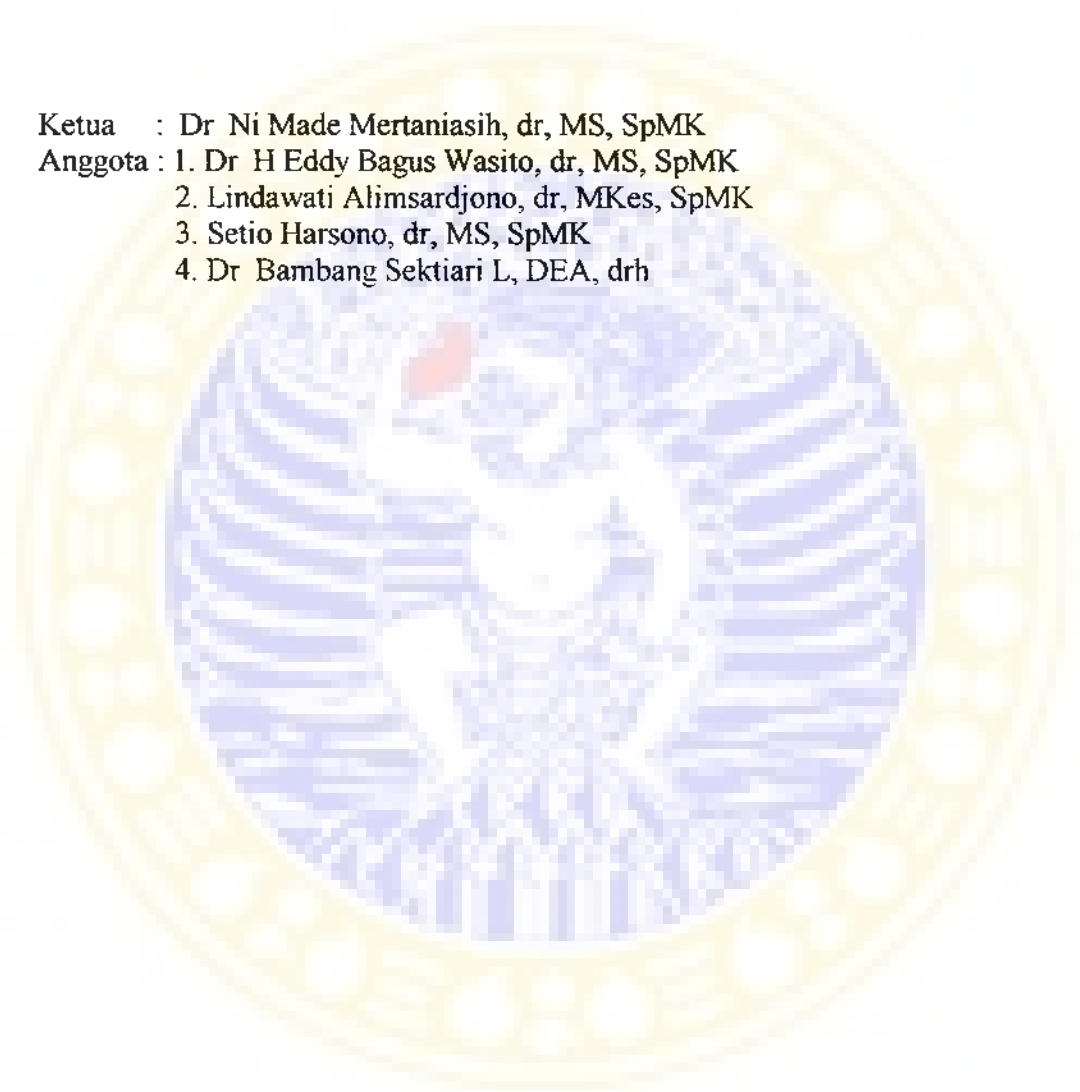
Pembimbing



Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK  
NIP.131 569 375

Telah diuji pada  
Tanggal 16 September 2004  
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr Ni Made Mertaniasih, dr, MS, SpMK  
Anggota : 1. Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK  
2. Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK  
3. Setio Harsono, dr, MS, SpMK  
4. Dr Bambang Sektiari L, DEA, drh



## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabbil Aalamiin, saya memanjatkan puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Dengan kerendahan dan ketulusan hati, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Bapak Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK, selaku pembimbing ketua sekaligus sebagai dosen mata kuliah Mikrobiologi, sebagai Ketua Minat Mikrobiologi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Unair, dan juga sebagai penanggung jawab Laboratorium Gastroenteritis *Tropical Disease Center (TDC)* Unair tempat saya melakukan penelitian. Beliau dengan sabar dan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, dan saran serta meluangkan waktu setiap saya memerlukan bimbingan mulai dari penyusunan proposal hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Ibu Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK, selaku pembimbing sekaligus dosen selama kuliah, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran meluangkan waktu bila saya memerlukan bimbingan dan saran, mulai dari penyusunan proposal hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr Bambang Sektiari L, DEA, drh, yang telah memberikan bimbingan dalam menentukan uji statistik pada penelitian ini, ditengah kesibukan beliau,

dengan sabar membimbing, memotivasi dan masukan saran, selama penulisan proposal hingga penulisan tesis ini selesai.

Dalam kesempatan ini pula saya ucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini hingga selesainya penyusunan tesis ini, terutama kepada :

1. Rektor Unair Prof Dr Med, dr, Puruhito, SpB, TKV, atas kesempatan yang diberikan dan fasilitas yang disediakan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan pada Program Magister di Unair.
2. Direktur Program Pascasarjana Unair, Prof Dr H. Muhammad Amin, dr, SpP, dan seluruh stafnya, yang telah menerima dan memberikan kesempatan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Unair, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar (IKD).
3. Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD, yang telah banyak membantu selama saya mengikuti pendidikan di Pascasarjana Unair.
4. Seluruh Dosen Minat Mikrobiologi dan Dosen pada Program Pascasarjana Unair, yang telah mengajar, membimbing, memotivasi saya selama mengikuti kuliah.
5. Ketua *TDC* dan seluruh stafnya yang telah banyak membantu menyediakan fasilitas sehubungan dengan penelitian ini.

6. Kepala Balai Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya dan seluruh stafnya yang telah banyak membantu menyediakan fasilitas sehubungan dengan penelitian ini.
7. Seluruh pimpinan, dosen, dan staf Poltekkes Surabaya Jurusan Analisis Kesehatan yang telah banyak membantu menyediakan fasilitas sehubungan dengan penelitian ini.
8. Seluruh rekan mahasiswa sejawat angkatan 2002 : Wiwik Misaco, drh, Yunan Jiwintarum, SSi, MKes, Dian Rachmawati, dr, Lukas Seran, drs, Toni Hartono, drh, Abdul Majid, drs, serta kakak dan adik Minat Studi Mikrobiologi atas kerjasama yang baik selama kuliah tidak akan saya lupakan selamanya, terimakasih semuanya, dan seluruh staf sekretariat Mikrobiologi yang telah banyak membantu menyediakan fasilitas sehubungan dengan penelitian ini.
9. Khusus untuk suami tercinta Rachmad Pribadi, SE, yang dengan penuh kesabaran, kasih sayang, ketulusan, pengorbanan, dan perhatian yang luar biasa memberikan semangat, bantuan, sumbangan pikiran dan dorongan moril selama saya mengikuti pendidikan.
10. Untuk putri pertamaku yang cantik Putri Rachmah Irfa' Rani, yang senantiasa menjadi pelipur lara disaat rasa jenuh dan pendorong semangat belajar selama saya mengikuti pendidikan ini, terima kasih sayang.
11. Khusus untuk kedua orang tuaku Bapak dan Ibu Moekri yang selalu mengalirkan cucuran restu, doa, dan dorongan semangat yang tulus tiada henti-hentinya disaat-saat saya menghadapi ujian.

12. Untuk kakakku dan suami, adikku dan suami, kedua putri kecil kakakku Nadhiyas Aqmarina Priskideanasti dan Dhiyas Amira Nazmi Azahra, serta putra kecil adikku Nadhif Muhammad Iffat yang telah banyak memberikan dorongan semangat serta moril, selama saya mengikuti pendidikan.

Akhirnya kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu namanya yang telah banyak membantu baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga proses pembuatan tesis ini dapat berjalan dengan lancar dengan ini saya ucapkan terima kasih yang tiada terhingga.

Demikian semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala amal dan bantuan serta senantiasa memberikan pertolongan perlindungan serta kesuksesan bagi kita semua. Amin.

## RINGKASAN

### Efek Immunomodulator Propolis Pada Fagositosis Intraseluler *Salmonella typhi* Dari Makrofag Peritoneal Mencit.

Dwi Krihariyani

Propolis adalah lem lebah atau *bee glue* yang mengandung bahan kimia sangat kompleks, digunakan sebagai obat sejak beberapa tahun yang lalu, meskipun literatur yang menyebutkan tentang respons imun masih sedikit. Propolis dapat disebut sebagai imunomodulator karena di dalam propolis terdapat *caffeid acid phenethyl ester* dan *cinnamid acid*, yang dapat berperan dalam sistem kekebalan tubuh, menstimulasi proliferasi limfosit dan menginduksi produksi IL-1 dan IL-2.

Makrofag merupakan salah satu komponen sistem imun untuk melawan masuknya bakteri ke dalam tubuh. Ketika bakteri masuk ke dalam tubuh, makrofag akan melakukan fagositosis yang diikuti dengan penghancuran bakteri di dalam sel makrofag. Permukaan makrofag mempunyai beberapa reseptor sebagai mediator masuknya bakteri patogen ke dalam sel makrofag, antara lain reseptor manose dengan struktur *mannosylated* yang berikatan dengan reseptor yang terdapat pada permukaan bakteri, reseptor Fc merupakan reseptor opsonik IgG, reseptor *scavenger* dan reseptor komplemen. Bakteri berikatan dengan salah satu reseptor makrofag, kemudian memberikan signal dan terjadi transduksi di dalam *cytosolic* sehingga terbentuk fagosom.

*Salmonella typhi* adalah bakteri gram negatif dan merupakan bakteri fakultatif intraseluler. *Salmonella* dapat menyebabkan demam enterik dan mempunyai mekanisme virulensi untuk tetap hidup di dalam fagosom. *Salmonella* juga memiliki dua *pathogenicity island* yaitu SPI-1 dan SPI-2. SP-2 mengandung gen esensial untuk infeksi sistemik, replikasi intraseluler dan TTSS (*type III secretion system*) yang melindungi bakteri untuk tetap hidup dari proses degradasi.



Penelitian ini mempelajari efek imunomodulator propolis pada fagositosis intraseluler *Salmonella typhi* oleh makrofag peritoneal mencit.

Makrofag peritoneal diisolasi dari mencit jantan jenis BALB/c, berat badan rata-rata 30 gram, umur antara 6 sampai 8 minggu yang diinjeksi 10 ml PBS kedalam rongga peritonium. Abdominal dipijit-pijit selama 1 menit, kemudian cairan peritonium yang mengandung makrofag diambil dengan kateter intravena no 23, dimasukkan ketabung polipropilen dan dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok propolis dan non propolis. Kelompok propolis diberi 0,7 µl propolis sedangkan kelompok non propolis sebagai kontrol. Masing-masing kelompok diberi suspensi *Salmonella typhi* yang setara dengan kepadatan bakteri  $3 \times 10^8$  CFU/ml McFarland, kemudian masing-masing diamati jumlah bakteri yang terfagosit dan jumlah makrofag yang melakukan fagositosis dalam waktu 30, 60, 90, 120 menit. Rasio makrofag dibanding dengan bakteri pada uji fagositosis *invitro* adalah  $10^6 : 10^7$ .

Untuk mengamati aktivitas fagositosis intraseluler digunakan *double staining microscopy*, untuk membedakan bakteri yang sudah tertelan oleh makrofag (intraseluler) dan bakteri yang hanya menempel pada permukaan makrofag (ekstraseluler).

Rancang bangun penelitian adalah Faktorial (2x4). Faktor pertama adalah penambahan propolis, sedangkan faktor kedua adalah waktu pengamatan. Analisis data menggunakan *Multivariate Test* dan *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5%.

Dari data penelitian dapat ditunjukkan bahwa propolis dapat meningkatkan secara bermakna aktivitas fagositosis 2,65 lebih besar terhadap infeksi bakteri fakultatif intraseluler *Salmonella typhi*.

## SUMMARY

### Immunomodulator Effects of Propolis on Mice Peritoneal Macrophage Phagocytosis to *Salmonella typhi*.

Dwi Krihariyani

Propolis is honeybee product with a very complex chemical composition, which has been used in folk medicine since ancient times, although the literature about its effects on the immune response is scarce. Propolis called as immunomodulator, because it contains caffeic acid phenethyl ester and cinnamid acid, which both of them, act on host defense, stimulating lymphocyte proliferation and inducing IL-1 and IL-2 production.

Macrophage is one of the most important host-defence mechanisms against invading bacterium. When a bacterium enters the host, it is usually engulfed by macrophage. The macrophage surface has receptor molecules which mediate the engulfment of pathogenic bacteria by macrophage. These receptors include mannose receptors that bind mannosylated structures on the bacterial surface, Fc receptors that can internalize IgG-opsonized bacteria, scavenger receptors and complement receptors. Bacterial binding to one of these receptors often leads to signal transduction events at the cytosolic side that cause local cytoskeletal rearrangements necessary for bacterial engulfment into phagosomes.

*Salmonella typhi* is gram negative bacteria and facultatively intracellular bacteria. This enteric fever bacteria has evolved virulence mechanisms to survive in the harsh environment of the phagosome. Salmonella has two pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2. SPI-2 that contain the genes essential for the systemic infection, intracellular replication and the TTSS (type III secretion system) involved in the survival from degradation.

This study report about immunomodulator effects of propolis on mice peritoneal macrophage phagocytosis to *Salmonella typhi*.

Peritoneal macrophage cells were obtained from male BALB/c mice weighing approximately 30 gram, aged between 6 and 8 weeks old, which were

injected with 10 ml PBS in to abdominal cavity. After a soft abdominal massage for 1 minute, the peritoneal liquid was collected with intravena cateter and put in plastic tubes, and then were devided into non propolis and propolis group. The non propolis group was not given propolis acts as control, while the propolis group was given 0,7 µl propolis. Each group was given *Salmonella typhi* suspension equivalent to  $3 \times 10^8$  CFU/ml Mc Farland. Then the number of bacteria per macrophage and number of macrophage that contain bacteria in 30, 60, 90, and 120 second time were counted. For *in vitro* phagocytosis tests ratio macrophage to bacteria is  $10^6 : 10^7$ .

The activity of peritoneal macrophage intracellular phagocytosis was visualed by using double staining microscopy technique, which give a clear distinction between extracellular and intracellular bacteria.

Thias study use factorial design (2x4). One factor is adjusting propolis and the other is exposure time. To test the hypothesis, Multivariate Test and Univariate Analysis of Variance was used, followed by F test, at the level of significance 0.05.

The result showed that the propolis increased significantly the macrophage phagocytosis capacity 2.65 fold to facultatively by intracellular bacteria such as *Salmonella typhi*.

## ABSTRACT

### Immunomodulator Effects of Propolis on Mice Peritoneal Macrophage Phagocytosis to *Salmonella typhi*.

Dwi Krihariyani

This study report about immunomodulator effects of propolis on mice peritoneal macrophage phagocytosis to *Salmonella typhi*.

Peritoneal macrophage cells were obtained from male BALB/c mice weighing approximately 30 gram, aged between 6 and 8 weeks old, which were injected with 10 ml PBS in to abdominal cavity. After a soft abdominal massage for 1 minute, the peritoneal liquid was collected with intravena cateter and put in plastic tubes, and then were devided into non propolis and propolis group. The non propolis group was not given propolis acts as control, while the propolis group was given 0,7  $\mu$ l propolis. Each group was given *Salmonella typhi* suspension equivalent to  $3 \times 10^8$  CFU/ml Mc Farland. Then the number of bacteria per macrophage and number of macrophage that contain bacteria in 30, 60, 90, and 120 second time were counted. For *in vitro* phagocytosis tests ratio macrophage to bacteria is  $10^6 : 10^7$ .

The activity of peritoneal macrophage intracellular phagocytosis was visualaed by using double staining microscopy technique, which give a clear distinction between extracellular and intracellular bacteria.

This study use factorial design (2x4). One factor is adjusting propolis and the other is exposure time. To test the hypothesis, Multivariate Test and Univariate Analysis of Variance was used, followed by F test, at the level of significance 0.05.

The result showed that the propolis increased significantly the macrophage phagocytosis capacity 2.65 fold to facultatively by intracellular bacteria such as *Salmonella typhi*.

**Key words** : propolis, macrophage, *Salmonella typhi*

**DAFTAR ISI**

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	x
Summary .....	xii
Abstract .....	xiv
DAFTAR ISI .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xix
DAFTAR GAMBAR .....	xx
BAB1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan .....	7
1.4 Manfaat .....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	9
2.1 Imunomodulator .....	9
2.1.1 Definisi dan penggolongan .....	9
2.1.2 Cara kerja .....	14

2.1.3	Propolis sebagai imunomodulator .....	15
2.2	Makrofag .....	17
2.2.1	Asal makrofag .....	17
2.2.2	Fungsi dan peran .....	19
2.2.3	Aktivasi makrofag .....	21
2.2.4	Reseptor makrofag .....	23
2.3	Propolis sebagai imunomodulator pada aktivasi makrofag .....	27
2.4	<i>Salmonella typhi</i> .....	28
2.4.1	Ciri dan sifat .....	28
2.4.2	Respons imun terhadap <i>Salmonella typhi</i> .....	30
2.4.3	Mekanisme Salmonela untuk menghindari fagositosis makrofag .....	32
2.5	Fagositosis .....	34
2.5.1	Reseptor untuk fagositosis .....	40
2.5.2	Mekanisme fagositosis .....	41
2.5.3	Metode penilaian aktivitas fagositosis secara invitro .....	49
2.6	Imunoasai berlabel fluoresens .....	51
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....	54
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian .....	54
3.2	Hipotesis Penelitian .....	57
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN .....	58
4.1	Rancangan Penelitian .....	58
4.1.1	Uji fagositosis <i>in vitro</i> .....	58

4.2	Kriteria dan Ukuran Sampel .....	59
4.3	Variabel Penelitian .....	59
4.3.1	Uji fagositosis <i>in vitro</i> .....	59
4.3.2	Definisi operasional variabel .....	60
4.4	Alat dan Bahan Penelitian .....	62
4.4.1	Alat yang digunakan .....	62
4.4.2	Bahan-bahan penelitian .....	62
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	63
4.5.1	Lokasi penelitian .....	63
4.5.2	Waktu penelitian .....	63
4.6	Prosedur Pemeriksaan dan Pengumpulan Data .....	64
4.6.1	Persiapan propolis .....	64
4.6.2	Persiapan makrofag .....	65
4.6.3	Persiapan bakteri untuk uji fagositosis .....	65
4.7	Teknik Analisis Data .....	70
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN .....	71
5.1	Data Penelitian .....	71
5.2	Analisis dan Hasil Penelitian .....	74
BAB 6	PEMBAHASAN .....	83
BAB 7	PENUTUP .....	90
7.1	Kesimpulan .....	90
7.2	Saran .....	90

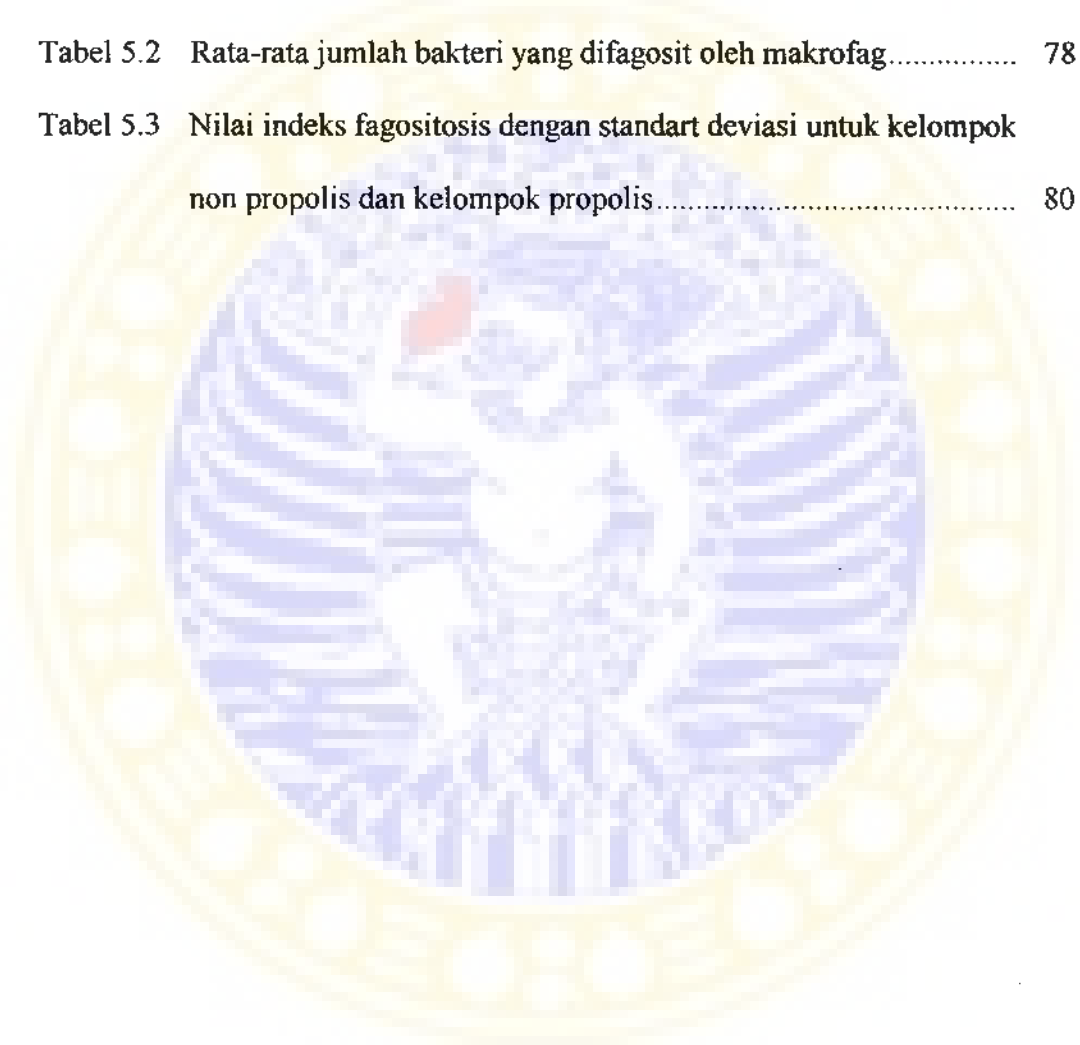
DAFTAR PUSTAKA ..... 92  
LAMPIRAN





## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Standar Mc Farland .....	68
Tabel 5.1 Persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis.....	75
Tabel 5.2 Rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag.....	78
Tabel 5.3 Nilai indeks fagositosis dengan standart deviasi untuk kelompok non propolis dan kelompok propolis.....	80



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Ringkasan efek berbagai imunomodulator .....	13
Gambar 2.2 Proses fagositosis diperantarai oleh reseptor opsonik.....	24
Gambar 5.1 Makrofag dengan bakteri intraseluler berwarna hijau. Pembesaran 400 × pada mikroskop fluoresens .....	73
Gambar 5.2 Makrofag dengan bakteri ekstraseluler berwarna merah oranye. Pembesaran 400 x pada mikroskop fluoresens .....	74
Gambar 5.3 Grafik persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis	76
Gambar 5.4 Grafik rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag....	79
Gambar 5.5 Grafik nilai indeks fagositosis dengan standart deviasi untuk kelompok non propolis dan kelompok propolis.....	81



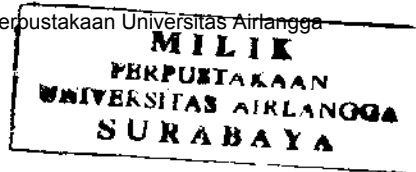
# BAB 1

# PENDAHULUAN

**BAB 1****PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Penyakit infeksi, khususnya yang disebabkan oleh bakteri, masih merupakan masalah kesehatan yang penting, terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Pemberian antibiotik memang telah banyak memberikan manfaat dalam pengendalian infeksi bakterial yaitu dengan tertundanya pertumbuhan kembali bakteri yang telah terpapar dengan antibiotik. Tetapi, pemakaian antibiotik yang terlalu sering juga menimbulkan masalah yang sulit penanganannya, diantaranya yaitu timbulnya resistensi bakteri terhadap antibiotik, yang dapat menimbulkan sifat resisten ganda yaitu resisten terhadap beberapa obat, disamping biaya pengobatan yang saat ini cukup mahal (Brooks *et al.*, 2001).

Kebanyakan resistensi terhadap obat pada bakteri enterik berdampak penyebaran resistensi lewat plasmid diantara berbagai genera yang berbeda. Sekitar 50% galur spesies *Shigella* pada berbagai belahan dunia sekarang bersifat resisten ganda. Resistensi *Salmonella* yang dibawa oleh binatang, khususnya terhadap obat (misalnya tetrasiklin) yang dicampur makanan. Penambahan obat kedalam makanan menyebabkan binatang tumbuh lebih cepat tapi berdampak pada munculnya organisme enterik yang resisten terhadap obat dalam flora lokal atau pada para pekerja. Peningkatan resistensi *Salmonella* terhadap antimikroba di Inggris membuat pemerintah melakukan



pembatasan suplemen antibiotik dalam makanan hewan. Penggunaan suplemen tetrasiklin yang terus menerus dalam makanan hewan di Amerika Serikat memperluas penyebaran resistensi plasmid dan *Salmonella* terhadap obat (Brooks *et al.*, 2001).

Upaya lain yang dapat dilakukan untuk mengendalikan penyakit infeksi adalah dengan peningkatan daya tahan tubuh. Peningkatan daya tahan tubuh dapat dilakukan dengan pengaturan respons imun (imunomodulasi), khususnya peningkatan respons imun (imunopotensiasi), dengan menggunakan bahan alam atau sintetik yang merupakan alternatif menarik untuk pencegahan dan pengobatan penyakit infeksi (Roitt *et al.*, 2001). Salah satu bahan alam yang dapat bersifat sebagai imunomodulator adalah propolis. Propolis sebagai imunomodulator juga diharapkan dapat digunakan untuk memperbaiki atau membangun kembali (imunorestorasi) sistem imun yang kurang sempurna atau mengalami disfungsi, baik karena sebab primer ataupun sekunder (Morahan *et al.*, 1982; Dimov *et al.*, 1991).

Imunomodulator ada yang bersifat spesifik terhadap antigen tertentu, dan ada yang bersifat nonspesifik. Contoh imunomodulator non spesifik yang telah dimanfaatkan secara klinis adalah vaksin BCG dan *Corynebacterium parvum*, yang dapat meningkatkan respons makrofag terhadap infeksi dan kanker karena adanya sekresi sitokin (limfokin) oleh limfosit T yang teraktivasi, misalnya IFN- $\gamma$ , TNF (Miller *et al.*, 1991; Abbas *et al.*, 2000). Kelemahan dari imunomodulator untuk menghasilkan sitokin yang mampu mengaktifkan makrofag memerlukan pemaparan berulang dengan antigen



spesifik. Tanpa adanya pemaparan dengan antigen spesifik setelah jangka waktu tertentu, maka dalam tubuh tidak akan dijumpai limfosit T spesifik teraktivasi yang mensekresi sitokin yang mengaktifkan makrofag, melainkan hanya ada sel memori yang tidak aktif mensekresi sitokin. Keadaan ini tentu saja membatasi nilai kemanfaatannya dalam jangka panjang. Selain itu imunomodulator tersebut sendiri bersifat antigenik dan progenik (Roitt *et al.*, 2001).

Dengan pertimbangan di atas, maka imunomodulator yang berasal dari makanan alam yang telah biasa dikenal masyarakat sehari-hari merupakan alternatif menarik untuk dipelajari dan dikembangkan, selain karena tingkat ketersediaannya yang tinggi, juga pengulangan pemberian mudah sekali dilakukan dalam diet sehari-hari.

Propolis disebut juga sebagai lem lebah atau propolis lebah, adalah substansi resin, berwarna kecoklatan yang dikumpulkan oleh banyak lebah. Lebah membuat propolis tersebut dengan mengumpulkan getah resin dari pohon-pohon dan mencampurnya dengan nectar dan membentuk substansi wax sebagai sarangnya. Propolis ini digunakan oleh lebah sebagai alat perlindungan dari kontaminasi luar dan pintu masuk ke dalam sarang untuk mensterilkan mereka saat keluar masuk sarang. Selanjutnya, propolis digunakan untuk tujuan komersial sebagai obat batuk berbentuk tablet, obat batuk sirup, pasta gigi, obat kumur, lipstik, kosmetik dan bisa digunakan untuk pernis alat musik seperti biola. Dari semua itu menunjukkan bahwa di dalam

propolis mempunyai aktifitas sebagai antimikrobia dan anti-inflamator (Anonimus, 2000).

Beberapa bahan yang terkandung di dalam propolis bergantung pada tempat, jenis pohon dan jenis tumbuhan berlainan yang dikoleksi. Sebagai contoh, beberapa kelompok bahan istimewa ditemukan pada propolis yang dikumpulkan dari Cuba dan Brazil yaitu antara lain: *flavonoids*, *phenolics* dan *terpenes*. *Flavonoids* mengandung *quercetin*, *apigenin*, *galangin*, *kaempferol*, *luteolin*, *pinocembrin*, *pinostrobin* dan *pinobanksin*. *Phenolic ester* yang berbentuk *caffeic acid phenethyl ester* atau CAPE terdapat dalam propolis mendapatkan perhatian masyarakat sebagai penemuan di bidang kesehatan karena sangat potensial untuk penyembuhan pada uji coba kerusakan spinal cord akibat suatu jejas (Anonimus, 2000).

Scheller *et al* (1998), menemukan bahwa ekstrak ethanol propolis dapat menginduksi produksi antibodi didalam sel limpa tikus. Propolis mengatur secara *in vivo* dan *in vitro* produksi C1q oleh makrofag seperti kerja sistem komplemen pada reseptor limpa, juga beraktivitas sebagai imunostimulan yang berhubungan dengan aktivasi makrofag dan peningkatan kapasitas fagositik dari makrofag.

Menurut Ivanovska *et al* (1993) dalam observasinya, *cinnamic acid* adalah salah satu komponen dalam propolis yang berperan dalam pertahanan tubuh, menstimulasi proliferasi limfosit dan memacu produksi IL-1 dan IL-2. Sedangkan menurut Sforcin (1996) propolis dapat bertindak sebagai *natural*

*killer* dengan meningkatkan jumlah hidrolase lisosom untuk melawan sel tumor.

*Port d'entre Salmonella typhi* adalah usus. Seseorang bisa menjadi sakit bila menelan organisme ini, sebanyak 50% orang dewasa menjadi sakit bila menelan sebanyak  $10^7$  kuman. Dosis dibawah  $10^5$  tidak menimbulkan penyakit. Organisme yang tertelan tadi masuk ke dalam lambung untuk mencapai usus halus. Asam lambung tampaknya kurang berpengaruh terhadap kehidupannya. Organisme secara cepat mencapai usus halus bagian proksimal, melakukan penetrasi kedalam lapisan epitel mukosa, setelah sampai di kelenjar getah bening regional mesentrium, kemudian terjadi bakterimia dan kuman sampai ke hati, limpa, juga sumsum tulang dan ginjal. *Salmonella typhi* segera difagosit oleh sel-sel fagosit mononukleus yang ada di organ tersebut. Di sini kuman berkembang biak memperbanyak diri. Inilah karakteristik dari *Salmonella typhi* yang akan menentukan perjalanan penyakit yang ditimbulkannya (Karsinah dkk, 1994).

Setelah periode multifikasi intraseluler, organisme akan dilepaskan lagi kedalam aliran darah, terjadi bakterimia kedua, pada saat ini penderita akan mengalami panas tinggi. Bakterimia ini menyebabkan dua kejadian kritis yaitu masuknya kuman ke dalam kantung empedu dan *plaque Peyer*. Bila dengan masuknya kuman tadi terjadi reaksi radang yang hebat sekali maka akan terjadi nekrosis jaringan yang secara klinik ditandai dengan kolesistitis nekrotikans, dan perdarahan perforasi usus. Masuknya kuman di kandung empedu dan *plaque Peyer* menyebabkan kultur tinja positif, dan invasi ke



dalam kandung empedu sendiri dapat menyebabkan terjadinya *carrier* kronik (Karnisah dkk,1994).

Fagositosis oleh makrofag merupakan bentuk pertahanan pertama tubuh terhadap infeksi bakteri (Betjes, 1994). Peningkatan kedua fungsi tersebut diharapkan dapat menurunkan insiden penyakit infeksi bakteri, baik akut maupun kronis. *Salmonella typhi* dipilih sebagai kuman uji pada penelitian ini, karena kuman tersebut adalah patogen intrasel pada manusia yang mampu menghindar atau bertahan dari proses pembunuhan intraseluler oleh makrofag normal atau istirahat. Hal ini disebabkan *Salmonella* memiliki dua daerah pertahanan yaitu SPI-1 dan SPI-2 yang mampu melindungi diri dari proses penggabungan antara fagosom dan lisosom (Karlsson, 2004). *Salmonella typhi* dapat dibunuh secara efektif oleh makrofag teraktivasi, sehingga kuman ini dapat dipakai sebagai uji peningkatan kemampuan fagositosis intraseluler yang merupakan salah satu ciri makrofag teraktivasi (Roitt *et al.*, 2001). Ada tidaknya peningkatan fagositosis terhadap *Salmonella typhi* sebagai salah satu bakteri intraseluler diidentifikasi dengan menggunakan metode *double staining fluorescence* (Drevet & Campbel, 1991).

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian propolis dapat meningkatkan kemampuan fagositosis intraseluler *Salmonella typhi* dari makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c secara *in vitro*?

2. Apakah lama waktu pemaparan antara makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c dengan kuman *Salmonella typhi* secara *in vitro* berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis intraseluler?
3. Adakah intersepsi atau interaksi pemberian propolis terhadap aktivitas fagositosis peritoneal makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c dengan kuman *Salmonella typhi* secara *in vitro* dalam interval waktu tertentu?

### 1.3 Tujuan

1. Tujuan umum

Mengetahui efektifitas propolis dalam meningkatkan kemampuan fagositosis intraseluler dari peritoneal makrofag mencit jantan jenis BALB/c terhadap *Salmonella typhi* dalam interval waktu tertentu.

2. Tujuan khusus

Menguji dan menganalisis efektifitas propolis dalam meningkatkan kemampuan fagositosis intraseluler dari peritoneal makrofag mencit jantan jenis BALB/c terhadap *Salmonella typhi* secara *in vitro* dalam interval waktu tertentu.

## 1.4 Manfaat

1. Manfaat bagi perkembangan ilmu Pengetahuan
  - a. Mengungkap informasi tentang efek pemberian propolis sebagai imunomodulator, khususnya terhadap kemampuan fagositosis bakteri intraseluler oleh makrofag.
  - b. Memberikan landasan bagi penelitian tentang sejauh mana tingkat aktivasi makrofag dengan penambahan propolis, khususnya untuk aplikasi klinisnya, misalnya respon terhadap mikroba lain seperti jamur, virus, parasit intraseluler, dan efek anti kanker.
2. Manfaat bagi penggunaan praktis
  - a. Sebagai dasar untuk mengembangkan kemungkinan menjadikan propolis dalam diet sebagai upaya untuk meningkatkan daya tahan tubuh penderita yang mengalami supresi fungsi sistem imunitas atau penderita infeksi bakterial yang berat khususnya yang dirawat di rumah sakit.
  - b. Sebagai dasar untuk mengembangkan kemungkinan menjadikan propolis sebagai suplemen dalam diet masyarakat sehari-hari untuk meningkatkan daya tahan tubuh.



## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Imunomodulator**

##### **2.1.1 Definisi dan penggolongan**

Imunomodulator adalah zat yang dapat secara langsung mengubah aktivitas fungsi sistem imun tertentu baik secara positif maupun negatif (Jaffe dan Sherwin, 1991; Baratawidjaja, 2001). Perubahan aktivitas sistem imun dapat berupa :

- a. **Imunopotensiasi (*up regulation*)** terdiri dari:
  1. **Imunostimulasi**, yaitu memperbaiki sistem imun dengan bahan yang merangsang sistem tersebut. *Biological Response Modifiers (BRMs)* adalah bahan-bahan yang dapat merubah respons imun, biasanya untuk meningkatkan respons imun.
  2. **Imunorestorasi**, yaitu mengembalikan sistem imun yang terganggu dengan mengganti komponen sistem imun yang terganggu, seperti imunoglobulin dalam bentuk ISG atau HSG (*Immune/ Hyperimmune Serum Globulin*), plasmaferesis, lekaferesis, transplantasi sumsum tulang, timus (Baratawidjaja, 2001). Imunorestorasi juga dapat dilakukan dengan mengoreksi fungsi komponen sistem imun yang terganggu dengan pemberian imunomodulator (Morahan, 1982).

- b. Imunosupresi (Down regulation), penekanan respons imun, baik respons yang normal (misalnya pada transplantasi), atau yang berlebihan (misalnya pada alergi, penyakit autoimun).

Umumnya imunomodulator digolongkan sebagai berikut (Baratawidjaja, 2001) :

a. Biologik :

1. Limfokin yang juga disebut interleukin atau sitokin dihasilkan oleh limfosit yang diaktifkan dan diduga memegang peranan penting dalam respons imun seluler. Contohnya ialah *macrophage activating factor (MAF)*, *macrophage growth factor (MGF)*, *T-cell growth factor* atau interleukin 2, *colony stimulating factor (CSF)* dan interferon gama. Beberapa jenis limfokin seperti interleukin-2 dan *tumor necrosis factor (TNF)* yang dihasilkan makrofag telah dapat dibuat dengan rekayasa genetik
2. Hormon timus; sel epitel timus memproduksi beberapa jenis hormon yang berfungsi dalam pematangan sel T dan modulasi fungsi sel T yang sudah matang. Ada 4 jenis hormon timus, yaitu timosin alfa, timolin, timopoietin dan faktor humoral timus. .
3. Antibodi monoklonal, diperoleh dari fusi sel T dan sel B yang hidup dalam kultur sel, sehingga antibodi tersebut dapat dihasilkan dalam jumlah besar. Antibodi monoklonal dapat mengikat komplemen, membunuh sel tumor manusia dan tikus *in vivo*.

4. Ekstrak lekosit atau transfer faktor, misalnya *dialysed leucocyte extract* dan *transfer factor*. Adanya imunostimulasi oleh transfer faktor yang spesifik asal lekosit terlihat pada penyakit-penyakit sebagai berikut:
  - candidiasis mukokutan kronik
  - *coccidiomycosis*
  - *lepra lepromatus*
  - tuberculosis
  - vaksinia gangrenosa (melalui transfusi lekosit)
5. Asal bakteri, misalnya *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) adalah *Mycobacterium bovis* hidup yang diatenuasikan dan dapat mengaktifkan sel T, memperbaiki produksi limfokin dan mengaktifkan sel NK. *Corynebacterium parvum* adalah bakteri *C. parvum* mati yang digunakan sebagai imunostimulan mempunyai sifat mirip BCG digunakan sebagai imunostimulasi non spesifik pada keganasan. Endotoksin (LPS) adalah komponen dinding bakteri gram negatif seperti *E. coli*, *Shigella* dan *Salmonella* yang dapat merangsang proliferasi sel B dan sel T serta mengaktifkan makrofag.
6. Asal jamur, misalnya lentinan, glukon, krestin. Selain bahan biologik di atas, banyak peneliti menemukan bahan alam lain yang mempunyai efek imunomodulator, misalnya derivat larut air dari propolis atau lem lebah (Dimov *et al.*, 1992), tanaman atau bahan

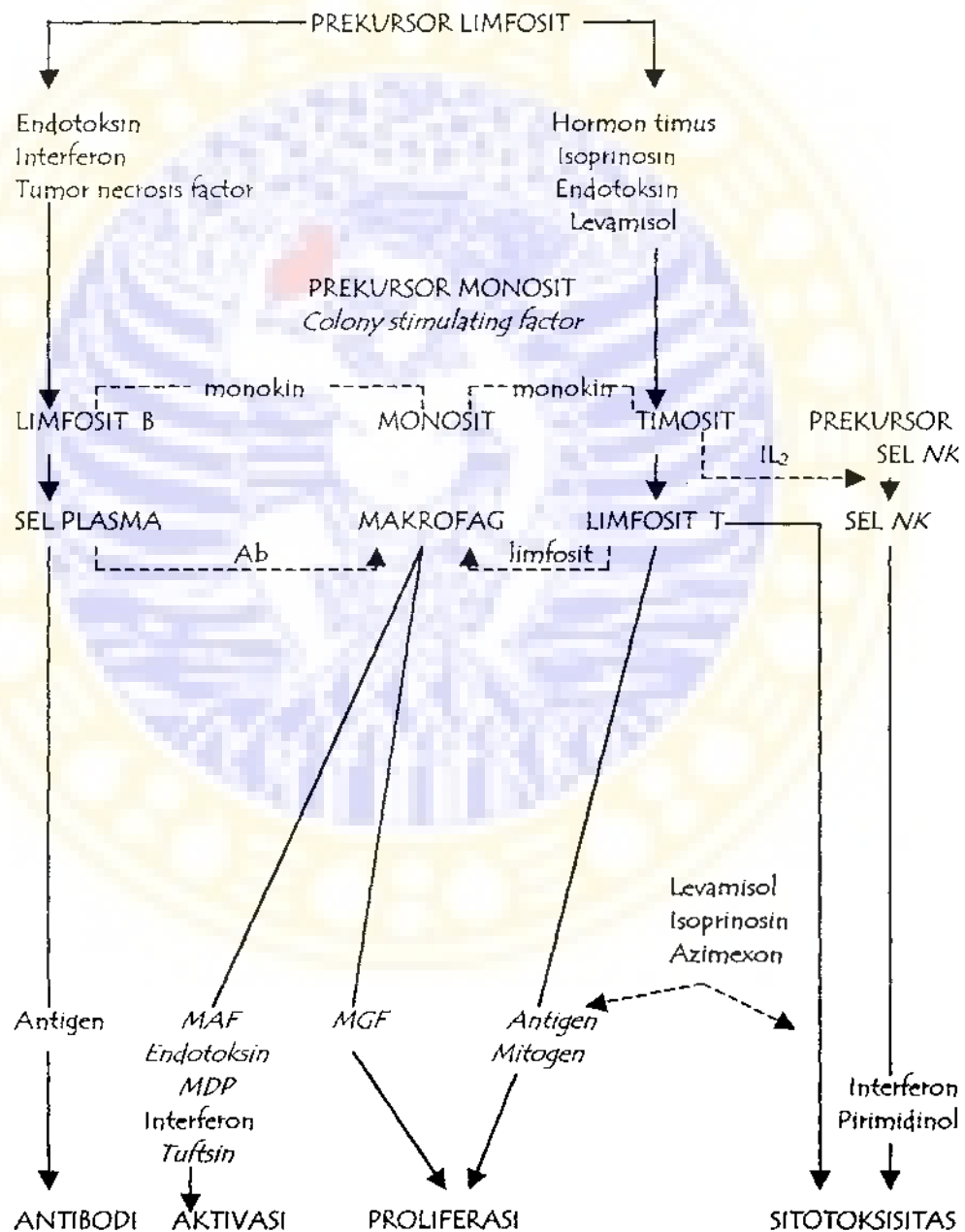
makanan seperti *Picrorhiza kurroa* (Puri *et al.*, 1992), kedelai, teh, bawang putih, paku-pakuan, kacang bahkan beras dan jagung juga memiliki potensi imunomodulator (Koga, 1993).

b. Sintetik

1. Agen farmakologik, misalnya levamisol merupakan derivat tetramizol, obat cacing yang dapat meningkatkan proliferasi dan sitotoksitas sel T. Isoprinosin atau inosipleks (ISO) adalah bahan sintesis yang mempunyai sifat antivirus dan juga meningkatkan proliferasi dan toksitas sel T seperti halnya dengan levamisol. ISO diduga membantu produksi limfokin (interleukin-2) yang berperan pada diferensiasi limfosit, makrofag dan peningkatan fungsi sel fungsi sel NK. *Muramil dipeptida (MDP)* merupakan komponen aktif terkecil dari dinding sel *mycobacterium*. Bahan tersebut telah dapat disintesis dan pada pemberian oral dapat meningkatkan sekresi enzim dan monokin. Efeknya adalah langsung dan tidak memerlukan limfokin atau pengaruh yang lain. Bila diberikan bersama minyak dan antigen, *MDP* dapat meningkatkan baik respons seluler maupun respons humoral.
2. Molekul sintetik lain, misalnya *azimexon* dan *ciamexon* yang diberikan secara oral dapat meningkatkan respons imun seluler. Bestatin yang diberikan secara oral dapat meningkatkan respons imun seluler dan humoral. *Tuftsine* yang diberikan secara parenteral dapat meningkatkan fungsi makrofag, sel NK dan granulosit.



*Maleic, anhydride, divinil ether copolymer* yang diberikan secara parenteral dapat meningkatkan fungsi makrofag dan sel NK. *6-phenyl-pyrimidol* yang diberikan secara oral dapat meningkatkan fungsi makrofag dan sel NK.



Gambar 2.1 Ringkasan efek berbagai imunomodulator (Baratawidjaja, 2001)

### 2.1.2 Cara kerja

Berdasarkan target kerjanya imunomodulator dibedakan menjadi (Katz, 1993)

- a. Imunomodulator spesifik, yaitu imunomodulator yang mengubah respons imun terhadap antigen spesifik, misalnya Ab monoklonal, CSF, faktor transfer.
- b. Imunomodulator nonspesifik, yaitu imunomodulator yang mengubah respons imun terhadap antigen nonspesifik, misalnya BCG, endotoksin levamisol dan timosin.

Imunostimulasi dapat dilakukan dengan imunomodulator spesifik maupun nonspesifik, sedang immunosupresi dilakukan dengan imunomodulator spesifik (Seaman, 1991).

Mekanisme kerja imunomodulator dapat terjadi melalui interaksinya dengan antigen, atau interaksi dengan sistem imun hospes. Imunomodulator yang berinteraksi dengan antigen (misalnya aluminium hidroksida, *Freund's complete adjuvans*) bekerja dengan memperpanjang retensi imunogen, meningkatkan ukuran efektif imunogen dan mengubah sifat kelarutan, sehingga mengakibatkan pemanjangan waktu dan peningkatan besar respons imun.

Adapun titik tangkap imunomodulator yang berinteraksi dengan sistem imun hospes dapat terjadi pada setiap tempat dalam jalur

imunoregulasi, misalnya pada sel B, T, NK. Sel-sel aksesori, dengan cara (Katz, 1993) :

- a. Meningkatkan atau menekan perekrutan dan pengaktifan sel imunokompeten di tempat antigen.
- b. Merangsang atau menekan proliferasi, diferensiasi dan aktivasi sel pengatur imun.
- c. Meningkatkan atau menekan metabolisme sel-sel dalam sistem imun, misalnya pembentukan cAMP, cGMP.

### **2.1.3 Propolis sebagai imunomodulator**

Propolis disebut juga sebagai lem lebah atau propolis lebah, adalah substansi resin, berwarna kecoklatan yang dikumpulkan oleh banyak lebah. Lebah membuat propolis tersebut dengan mengumpulkan getah resin dari pohon-pohon dan mencampurnya dengan nektar dan membentuk substansi wax sebagai sarangnya. Propolis ini digunakan oleh lebah sebagai alat perlindungan dari kontaminasi luar dan pintu masuk kedalam sarang untuk mensterilkan mereka saat keluar masuk sarang. Pada jaman dahulu menurut cerita, propolis dipakai oleh rakyat sebagai obat dan digunakan secara resmi sebagai obat paten pada tahun 1600-an di London. Selanjutnya, propolis digunakan untuk tujuan komersial sebagai obat batuk berbentuk tablet, obat batuk sirup, pasta gigi, obat kumur, lipstik, kosmetik dan bisa digunakan untuk pernis alat musik seperti biola. Susunan kimia didalam propolis sangat kaya akan bahan-bahan potensial

yang bermacam-macam, seperti *terpenes* dan *benzoic, caffeic, cinnamic* dan *phenolic acids* (Challem, 1995).

Beberapa bahan yang terkandung di dalam propolis bergantung pada tempat, jenis pohon dan jenis tumbuhan berlainan yang dikoleksi. Sebagai contoh, beberapa kelompok bahan istimewa ditemukan pada propolis yang dikumpulkan dari Cuba dan Brazil yaitu antara lain: *flavonoids, phenolics* dan *terpenes*. *Flavonoics* mengandung *quercetin, apigenin, galangin, kaempferol, luteolin, pinocembrin, pinostrobin* dan *pinobanksin*. *Phenolic ester* dalam bentuk *caffeic acid phenethyl ester* atau CAPE yang ada pada propolis mendapatkan perhatian masyarakat sebagai penemuan di bidang kesehatan karena sangat potensial untuk penyembuhan pada uji coba kerusakan spinal cord akibat suatu jejas (Anonimus, 2000).

Propolis Gold yang digunakan untuk penelitian ini dalam *product knowledge* adalah *Bee Glue* (liur lebah) merupakan zat pelindung sarang lebah bagian dalam dan luar yang dapat digunakan sebagai makanan tambahan yang tidak toksik, dapat digunakan sebagai obat dan tanpa efek samping. Propolis ini mengandung substansi yaitu: 1) Resin. 2) *Wax* (lilin). 3) Minyak esensial. 4) Asam amino. 5) *Bio Flavanoid*. 6) Vitamin K. 7) Mineral (Mg, S, Chloor, Zn, P, Ca, Na). 8) Enzym (Diatase, Lepase, Kataloge). *Bio Flavanoid* adalah sebagai antibiotik yaitu anti bakteri, anti jamur dan anti virus dan sebagai antioksidan seperti polusi udara, gas Co, rokok, sinar infra merah, bahan pengawet dan air limbah. Sedangkan efek

dari propolis tersebut adalah berpengaruh terhadap sistem kekebalan tubuh, sebagai sumber energi dan membuat badan lebih sehat.

Isolasi dan identifikasi campuran bahan propolis yang dikoleksi dari Brazil dapat mempertinggi penyebaran dan pergerakan makrofag. Propolis yang dikoleksi dari Brazil (*Brazilian Propolis*) ini diinduksikan kedalam sel murin sehingga sel efektor murin teraktivasi. Dari propolis ini kita dapat mengisolasi dan identifikasi 6 campuran bahan yang larut dalam air. Dari 6 bahan tersebut semua menunjukkan peningkatan penyebaran dan gerakan makrofag. Bahan tersebut merupakan derivat dari *caffeoylquinic acid* yaitu : *5-caffeoylquinic acid* (1), *chlorogenic acid* (2), *4-caffeoylquinic acid* (3), *4,5-dicaffeoylquinic acid* (4), *3,5-dicaffeoylquinic acid* (5) dan *3,4-dicaffeoylquinic acid* (6) (Tatefuji *et al.*, 1996).

Propolis yang dikumpulkan dari Amerika digunakan untuk uji aktivitas antimikrobial. Cara yang digunakan yaitu dengan menempatkan 0,2 g propolis ke dalam sumur pada plate agar secara difusi. Kemudian ditambahkan 1,0% biakan suspensi bakteri di atas media agar, lalu dievaluasi. Hasil evaluasi menunjukkan adanya zona hambat. (Mundo *et al.*, 2002).

## 2.2 Makrofag

### 2.2.1 Asal makrofag

Makrofag adalah salah satu komponen sistem imun yang mempunyai peran unik dan strategik. Makrofag bersama monosit

merupakan anggota sistem fagosit mononuklear (*Mononuclear Phagocyte System/MPS*), yaitu populasi sel berinti tunggal yang mempunyai fungsi utama fagositosis (fagosit profesional). Makrofag berasal dari sel induk nonlimfosit (*myeloid progenitor*) yang menurunkan antara lain monoblas dalam sumsum tulang. Pembelahan satu monoblas menghasilkan dua sel promonosit yang masing-masing membelah menjadi dua monosit. Produksi monosit ini dikontrol oleh sejumlah faktor antara lain Interleukin-3 (IL-3) dan faktor pertumbuhan seperti GM-CSF (*Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor*), M-CSF (*Monocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*). Proses perkembangan dari monoblas menjadi monosit umumnya berlangsung dalam 6 hari (Miller *et al.*, 1991).

Monosit yang baru terbentuk masih berada dalam sumsum tulang kurang dari 24 jam sebelum akhirnya dilepas ke sirkulasi sebagai sel yang belum mengalami maturasi atau diferensiasi sempurna. Sel-sel tersebut kemudian bermigrasi dari pembuluh darah ke jaringan dan rongga-rongga serosa setelah 12 – 102 jam. Sekali mencapai jaringan atau rongga serosa, monosit menjadi makrofag yang matang dan berdiferensiasi lengkap. Masa hidup makrofag dapat mencapai beberapa bulan bahkan tahun.

Makrofag terdapat dalam berbagai organ dan jaringan penyambung, dan diberi nama sesuai lokasi spesifiknya. Misalnya histiosit (dalam jaringan penyambung), sel mikroglia (dalam SSP), sel “Kupffer” (dalam sinusoid vaskuler hepar), makrofag alveolar (dalam paru), makrofag pleural dan peritoneal (dalam rongga serosa), makrofag jaringan

tetap (*fixed tissue macrophage*) dan makrofag bebas dalam limpa, limfonodi, sumsum tulang, dan jaringan lain (Abbas *et al.*, 2000).

Pada waktu peradangan, jumlah makrofag meningkat secara cepat karena peningkatan kedatangan monosit dari darah, ditambah peningkatan pembelahan makrofag dalam jaringan. Kadang-kadang ditemukan fagosit besar dengan inti banyak yang disebut sel datia (*giant cell*). Sel ini berasal dari fusi beberapa sel makrofag atau dari pembelahan makrofag berulang-ulang tanpa diikuti sitokinesis.

### 2.2.2 Fungsi dan peran

Makrofag mempunyai peran yang penting dalam imunitas alamiah maupun spesifik. Dalam imunitas spesifik, makrofag terlibat dalam ketiga fase yaitu fase pengenalan (kognitif), aktivasi, serta efektor (Abbas *et al.*, 2000).

#### a. Dalam imunitas alamiah

1. Makrofag memfagosit partikel asing seperti mikroba, makromolekul, jaringan atau sel yang rusak, diikuti dengan degradasi dalam sel tersebut.
2. Makrofag memproduksi sitokin (G-CSF, GM-CSF) yang merekrut sel radang lain terutama netrofil.
3. Makrofag berperan dalam biosintesa protein sistem komplemen (C1, C2, C3, C4, C5, Properdin, Faktor B, Faktor D, inaktivator C3b, akselerator inaktivator C3b). Meski secara kuantitatif produksi

protein ini lebih kecil dari jumlah yang diproduksi hepatosit, tapi secara kualitatif, sekresi dari makrofag lebih bermakna sebab terjadi ditempat radang.

b. Dalam sistem imun spesifik

1. Makrofag bertindak sebagai sel penyaji antigen protein (*antigenpresenting cell/ APC*) dipermukaanya agar dikenal oleh limfosit T. Makrofag juga memproduksi protein yang meningkatkan aktivasi limfosit T (IL-1).
2. Pada beberapa bentuk respons imun seluler, makrofag yang diaktifkan oleh limfokin berperan sebagai sel efektor yang lebih efisien dalam fungsi fagositosis, degradasi dan sitosidal.
3. Makrofag mempermudah eliminasi antigen yang terluputi oleh antibodi spesifik dengan fagositosis.
4. Makrofag memproduksi sitokin yang menginduksi proliferasi limfosit T dan B (IL-1 dan IL-6)
5. Makrofag memproduksi TNF yang memberikan kemampuan membunuh sel tumor langsung melalui efek toksik terhadap sel tumor atau secara tak langsung dengan mobilisasi berbagai respons hospes secara *in vivo* (Abbas *et al.*, 2000).

Dengan banyaknya fungsi makrofag tersebut diatas, maka makrofag berperan besar dalam mengawali dan mengatur respons imun (Subowo, 1993). Selain itu makrofag juga mempunyai fungsi penting diluar sistem imun yaitu :



- Penyembuhan luka, termasuk didalamnya pengaturan koagulasi dan fibrinolisis, pembersihan jaringan yang rusak, sekresi enzim kolagenase, pengaturan angiogenesis, endotel dan fibroblas, serta resorpsi tulang.
- Metabolisme lipid, yaitu pemindahan sisa khilomikron dan lipoprotein, sekresi apolipoprotein.
- Pengaturan penyediaan granulosit dan eritrosit melalui sekresi CSF dan eritropoetin.

### 2.2.3 Aktivasi makrofag

Makrofag yang teraktifkan (*activated macrophages*) memiliki morfologi, aktivitas metabolisme serta kapasitas fungsi yang berbeda dengan makrofag normal atau istirahat (*normal/resting/resident macrophage*), yaitu :

- Perubahan morfologi atau struktur:

Ukuran sel dan jumlah granula sitoplasma meningkat, lipatan atau kerutan membran lebih banyak, ekspresi MHC, reseptor Fc, dan reseptor non imun lain meningkat.

- Perubahan sitokimia atau biokimia :

Glikolisis, transport nutrisi meningkat, reseptor C3b diaktifkan, produksi radikal bebas  $\text{NO}/\text{O}_2^-$  meningkat .

- Perubahan fungsi :

Kecepatan migrasi meningkat, melekat ke kaca lebih cepat, produksi kolagenase, aktivator plasminogen dan prostaglandin meningkat, produksi sitokin dan komplemen meningkat,

fagositosis dan pinositosis meningkat, kemampuan mikrobisidal meningkat, memiliki aktivitas anti tumor (Werb,1991).

Pengaktifan makrofag dapat terjadi melalui dua cara, yaitu melalui produk limfosit T (limfokin) yang disebut pengaktifan secara spesifik atau imunologik, atau melalui senyawa lain yang bekerja langsung pada membran makrofag seperti endotoksin, mitogen, atau imunomodulator, yang disebut pengaktifan secara nonspesifik atau non imunologik (Werb, 1991 ; Baratawidjaja, 2001 ; Abbas *et al.*, 2000). Pengaktifan dapat terjadi dalam beberapa menit sampai 72 jam bahkan lebih (Rocklin, 1982 ; Puri *et al.*, 1992 ; Greenberg *et al.*, 1993).

Sekali diaktifkan, maka makrofag teraktivasi secara nonspesifik. Aktivasi makrofag oleh suatu antigen tidak hanya meningkatkan respons terhadap antigen tersebut saja, tetapi juga terhadap antigen lain yang dijumpai makrofag dalam tubuh. Namun dengan adanya perbedaan sifat populasi makrofag di jaringan atau organ yang berbeda, bahkan dalam subpopulasi makrofag di suatu jaringan yang sama, maka pengaktifan makrofag tidak berakibat sama pada tiap makrofag dan menjadi suatu fenomena yang kompleks. Pengaktifan makrofag tidaklah bersifat *all in one*. Beberapa makrofag meningkat aktivitas mikrobisidalnya, tapi tidak meningkat toksisitasnya terhadap tumor. Bahkan stimulasi IFN- $\gamma$  saja memungkinkan makrofag membunuh bakteri intraseluler *Legionella*, namun justru meningkatkan pertumbuhan *M. tuberculosis* (Roitt *et al.*, 2001). Namun menurut Wing & Remington (1978) dan Greenberg &

Silverstein (1993), secara umum fungsi makrofag ditingkatkan khususnya fagositosis yang merupakan fungsi utamanya.

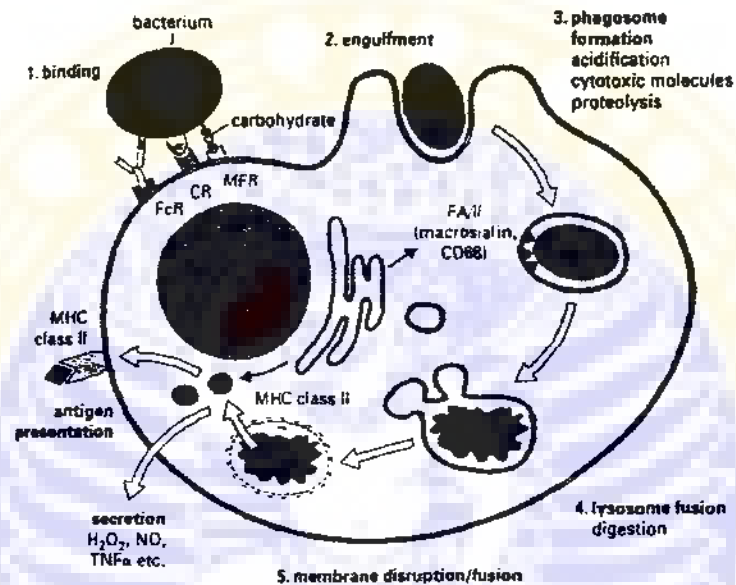
#### 2.2.4 Reseptor makrofag

Menurut Roitt *et al.*, 2001, makrofag terlibat dalam proses *clearance* pada sel yang mengalami apoptosis dan inflamasi. Makrofag juga mengekspresikan reseptor yang bervariasi pada membran plasma, reseptor tersebut dapat berinteraksi dengan sel lain, matriks ekstraseluler dan mikroorganisme. Hal ini berguna untuk membedakan reseptor opsonik (sebagai contoh, untuk antibodi dan komplemen) dari reseptor non opsonik. Proses fagositosis diperantarai oleh reseptor opsonik yaitu:

1. Agen patogen seperti bakteri terikat pada reseptor opsonik termasuk reseptor Fc, reseptor komplemen dan reseptor untuk karbohidrat (*MR - mannose receptor*).
2. Partikel bakteri akan tertelan dan terbentuk fagosom.
3. Proses pengasaman (*acidification*) pada fagosom yang diikuti dengan pembentukan molekul toksik (oksigen reaktif dan nitrogen intermediats) terdorong masuk kedalam fagosom. Marker FA/11 terletak pada membran fagosom.
4. Lisosom menyatu dengan fagosom dan melepaskan enzim proteolitik kedalam fagolisosom dan menghancurkan bakteri.

5. Pada saat membran fagolisosom akan mengalami kerusakan, fragmen antigen akan berinteraksi dengan MHC klas II dan antigen akan lebih mudah disajikan.

Proses ini akan merangsang sekresi molekul toksik dan sitokin.



Gambar 2.2 Proses fagositosis diperantarai oleh reseptor opsonik (Sumber Roitt, 2001, p 153).

#### a. Reseptor manosa

Makrofag dapat mengekspresikan lectin yang bervariasi, bersifat spesifik untuk ikatan gula. Reseptor manosa (*Mannose Receptor = MR*) memiliki pola unik pada jaringan homeostatis sebagai alat pertahanan tubuh. Reseptor ini didominasi oleh 8 lectin tipe C yang bertanggung jawab untuk endositosis dan fagositosis dari manosa atau glikokonjugat yang berhubungan. Ikatan endogen termasuk *lisosomal hidrolase* dan

*mieloperoksidase*, yang berperan untuk organisme prokariotik dan eukariotik yang mengekspresikan struktur sebagai ikatan manosa. Penambahan *N-terminal cystein-rich* pada reseptor manosa merupakan lectin yang berbeda untuk glikokonjugat yang banyak diekspresikan pada organ limfoid sekunder (*marginal methallophils, sucapsular sinus macrophages* dan *follicular dendritic cell*). Pola transport antigen adalah sel yang berhubungan atau reseptor manosa terlarut yang dapat mengantarkan antigen pada limfosit T atau B, sehingga terjadi pengaturan respons imun. Reseptor manosa yang mengandung *cystein-rich* memiliki peranan dalam penetralan hormon seperti lutropin yang mengandung struktur sulfat yang hampir sama (Roitt *et al.*,2001).

#### **b. Reseptor Komplemen**

Monosit dan makrofag mengekspresikan sejumlah reseptor heterodimer untuk produk pembelahan C3 (CR1, CR3, CR4) dan berinteraksi dengan komponen lain pada jalur aktivasi komplemen baik jalur klasik, *lectin induced*, atau jalur alternatif. CR3 memiliki peranan dalam perekrutan sel mielomonosit dengan cara adhesi untuk menginduksi ikatan endotel, termasuk *intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*, seperti pada manusia dan murin yang mengalami kelainan defisiensi genetik. CR3 adalah reseptor yang dapat berikatan dengan yang lain seperti fibrinogen, tetapi C3b tidak dapat berikatan seperti CR3. Dalam regulasi fagositosis mekanisme ingesti yang diperantarai CR3 sangat

berbeda dengan pola yang diperantarai oleh reseptor Fc. Proses inflamasi dan sekresi juga berbeda antara komplemen dan antibodi bebas. Reseptor komplemen juga berperan dalam menetralkan sel yang mengalami apoptosis dan pertahanan tubuh terhadap infeksi dan bertindak sebagai pintu masuk reseptor yang aman untuk organisme seperti *mycobacteria* melalui interaksi langsung setelah opsonisasi (Roitt *et al.*, 2001).

### c. Reseptor Fc

Terdapat berbagai reseptor opsonik untuk sub kelas imunoglobulin, terutama IgG. Reseptor Fc sendiri merupakan anggota superfamili imunoglobulin yang mengandung 2-3 *domain*, yang mengandung *immun receptor tyrosine-based activation motifs (ITAM)* atau *inhibitory (ITIM) motifs*. Dapat berinteraksi dengan molekul membran lain seperti  $\gamma$  *chain* dan sitoplasmik kinase atau fosfatase yang mengatur jalur signal kompleks. Terpisah dengan aktivasi respons efektor (fagositosis, endositosis, *antibodi-dependent cytotoxicity*). Reseptor Fc juga dapat mengatur rangkaian proses inflamasi dan mempunyai hubungan antara imunitas alamiah dan daptan. Mekanisme ingesti partikel yang telah terlapisi dengan antibodi berbeda dengan yang dijembatani oleh CR3. Selama fagositosis, interaksi reseptor ligan menyebabkan pembentukan pseudopodia yang mengelilingi partikel hingga terjadi fusi membran plasma pada ujungnya. Mekanisme ini disebut dengan “*zipper mechanism*” (Roitt *et al.*, 2001).

diatas dapat disimpulkan bahwa propolis dapat berperan pada host sebagai kekebalan non spesifik untuk mengaktivasi makrofag (Orsi *et al.*, 2000).

## 2.4 *Salmonella typhi*

### 2.4.1 Ciri dan sifat

Enterobacteriaceae merupakan kelompok bakteri gram-negatif berbentuk batang yang habitat alaminya berada pada sistem usus manusia dan binatang. Keluarga enterobacteriaceae meliputi banyak jenis yaitu *escherichia*, *shigella*, *salmonella enterobacter*, *klebsiella*, *serratia*, *proteus*, dan lainnya. Beberapa organisme, misalnya *Escherichia coli* merupakan flora normal dan dapat menyebabkan penyakit jika keluar dari habitatnya, sedangkan yang lain seperti *salmonella* dan *shigella* merupakan patogen yang umum bagi manusia. *Salmonella* adalah bakteri batang bersifat motil, mempunyai karakteristik memfermentasikan glukose dan mannose tanpa memproduksi gas, tetapi tidak memfermentasikan laktosa atau sukrose. Sebagian besar *salmonella* memproduksi H<sub>2</sub>S. mereka seringkali patogen untuk manusia atau binatang bila tertelan. Enterobacteriaceae mempunyai struktur antigenik yang kompleks. Mereka diklasifikasikan oleh lebih dari 150 antigen somatik O yang tahan panas (lipopolisakarida) yang berbeda, lebih dari 100 antigen K (kapsular) yang tidak tahan panas, lebih dari 50 antigen H (flagellar). Pada *Salmonella typhi*, antigen kapsular disebut antigen Vi.

Organisme hampir selalu masuk melalui jalan oral, biasanya dengan mengkontaminasi makanan atau minuman. Diantara faktor tempat yang mempengaruhi ketahanan terhadap infeksi salmonella adalah keasaman lambung, flora normal dalam usus, dan ketahanan lokal usus. Salmonella menyebabkan 3 tipe penyakit utama pada manusia, namun yang paling sering adalah tipe campuran. Tiga tipe penyakit tersebut adalah demam enterik (Demam tifoid) disebabkan oleh *Salmonella typhi*, bakteremia dengan luka lokal disebabkan oleh *Salmonella choleraesuis* dan enterokolitis disebabkan oleh *Salmonella typhimurium* dan *Salmonella enteritidis* (Brooks *et al.*, 2001).

Kemampuan bakteri salmonella untuk hidup intraseluler mungkin disebabkan adanya antigen Vi. Bakteri salmonella di usus melakukan penetrasi kedalam epitel, bakteri terus melalui lapisan epitel masuk kedalam jaringan subepitel sampai di lamina propira. Mekanisme biokimia pada saat penetrasi tidak diketahui dengan jelas tetapi tampak proses yang menyerupai fagositosis. Pada saat bakteri mendekati lapisan epitel, *brush border* berdegenerasi dan kemudian bakteri masuk kedalam sel. Mereka dikelilingi membran sitoplasma yang *interved*, seperti vakuol fagositik. Kadang-kadang penetrasi ke dalam epitel terjadi pada *intracellular junction*. Setelah penetrasi organisme difagosit oleh makrofag, berkembang biak dan dibawa oleh makrofag ke bagian tubuh yang lain (Brooks *et al.*, 2001).



Mengenai mekanisme pertahanan tubuh terhadap *Salmonella typhi* tampaknya antibodi humoral mengurangi jumlah organisme tetapi tidak berpengaruh terhadap bakteri yang sedang memperbanyak diri yang ada didalam jaringan. Populasi bakteri sistemik dapat dikurangi dan infeksi dapat dikontrol hanya bila aktivitas antibakteri intraseluler dari makrofag diaktifkan. Dalam hal ini bila makrofag diaktifkan oleh limfokin yang berasal dari limfosit spesifik yang telah tersensitisasi yang terjadi pada saat infeksi dini (Sujudi dkk, 1994).

#### **2.4.2 Respons imun terhadap *Salmonella typhi***

*Salmonella typhi* merupakan bakteri patogen intraseluler, walaupun menimbulkan respons antibodi yang mengakibatkan antitoksik langsung atau dengan perantaraan komplemen, fagositosis dan efek mikrobasid, namun yang terutama memulai perlawanan tubuh terhadap mikroorganisme intraseluler tersebut adalah limfosit T teraktivasi. Limfosit T (reaktif, terhadap antigen spesifik) yang beredar dalam limpa, kelenjar getah bening, plaque Peyer dan jaringan limfoid lainnya, setelah berkontak untuk pertama kalinya dengan mikroba akan mengalami mitosis dan berdeferensiasi menjadi atau merangsang produksi dari sel efektor T spesifik antigen. Dalam 2 atau 3 hari sel tersebut masuk ke dalam darah dan kemudian sampai ke jaringan yang mengalami infeksi. Di dalam jaringan, sel efektor T spesifik antigen mikroba dan terangsang untuk mengeluarkan berbagai faktor, yaitu :

- a. *Monocyte chemotactic factor*
- b. *Macrophage migration inhibition factor* (MIF = menarik makrofag dan mempertahankannya tetap di dalam daerah yang mengalami infeksi)
- c. *Macrophage activating factor* (MAF)
- d. *Specific macrophage arming factor* (SMAF)
- e. Faktor penghambat multifungsi virus (interferon)

Secara keseluruhan faktor di atas disebut limfokin (Sujudi dkk, 1994).

Monosit dalam darah dan makrofag yang tidak mendapat rangsangan mempunyai kemampuan sitolitik yang lemah. Dengan demikian mikroba patogen intraseluler seperti bakteri *Salmonella*, mungkin di caplok oleh lekosit polimorf atau makrofag, tetapi resisten terhadap efek mikrobasisid di dalam sel. Lekosit polimorf umumnya merupakan sel yang tidak dapat lagi mensintesa protein, sehingga merupakan bentuk akhir dari selnya. Monosit atau makrofag masih mempunyai potensi mensintesa RNA dan protein. Melalui berbagai mekanisme, makrofag dapat diaktifkan untuk sekresi kolagenase, aktivator plasminogen dan hidrolise lisosom ke daerah ekstraseluler sehingga dapat merusak sel sekitarnya. Pengaktifan makrofag demikian, memperbesar daya gerak makrofag dan aktivitas mikrobasisid dengan memperbesar daya metabolisme aerob dan produksi peroksida dan induksi sintesa enzim lisosom dan enzim lainnya. Makrofag yang aktif mempunyai efek

mikrobasid dan sitolitik yang tinggi baik spesifik dan non spesifik. Respons tubuh terhadap mikroorganisme intraseluler ditandai oleh nekrosis jaringan setempat, akumulasi limfosit pada berbagai tingkatan blastogenesis dan jumlah besar makrofag aktif yang mengandung sisa-sisa sel dan mikroba yang telah hancur. Kadang-kadang dapat ditemukan sel besar dengan banyak inti, yang terjadi akibat bersatunya beberapa makrofag (Sujudi dkk, 1994; Parslow *et al.*, 2001).

#### 2.4.3 Mekanisme Salmonella untuk menghindari fagositosis makrofag.

Salmonella merupakan bakteri gram negatif. Bakteri ini dapat termakan karena mengkontaminasi makanan dan minuman, kemudian masuk *Peyer's patches* dengan sel M nya, bakteri siap menyebar keseluruh tubuh. Kematian dapat disebabkan karena shok septik. Setelah terjadi fagositosis oleh makrofag, bakteri berada didalam *vacuole(phagose)*. Didalam fagosom akan terjadi penggabungan dengan bahan-bahan lisosomal, dan bakteri akan dihancurkan oleh aktivitas oksigen nitrit, yaitu reaksi oksigen dari bakteri dan asam hipoklorit. Monosit, netrofil dan beberapa sel epitel mukosa memiliki peptida antimikroba yang berperan didalam fagosom. Salmonella penyebab demam enterik (dan atau bakteri lain) memiliki mekanisme pertahanan untuk hidup didalam lingkungan fagosom. Selain itu Salmonella yang berada didalam makrofag memiliki alat pelindung terhadap sistim pertahanan tubuh humoral dan *neutrophil-mediated killing*. Kondisi seperti ini yang menyebabkan Salmonella

mudah melakukan transportasi dan replikasi. Alat pengatur pada *Salmonella* sehingga dapat menghindari aktifitas fagositosis adalah PhoP/PhoQ. Keduanya adalah komponen sistem sensor terhadap lingkungan dan akan mengubah ekspresi gen untuk menyesuaikan dengan lingkungan. PhoQ adalah integral membran protein yang mengaktifkan histidin kinase. Setelah PhoQ teraktivasi kemudian mengaktifkan bahan *phosphorylates* dari PhoP sitoplasmik, yang kemudian dipakai sebagai pengatur transkripsi. Signal didalam lingkungan fagosom tidak bersih, hal ini disebabkan karena kemungkinan meningkatnya level dari  $Ca^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$ , rendahnya pH dan karbon yang tidak cukup untuk pertumbuhan dasar. PhoP/PhoQ dapat menginduksi atau mengekspresikan lebih dari 40 gen. Ketika PhoP dalam sirkulasi, terjadi peningkatan modifikasi aktifitas LPS dan protein didalam dan diluar membran. Peningkatan aktifitas LPS dan protein ini merupakan awal dari kelangsungan hidup bakteri dan menekan keadaan lingkungan untuk melindungi bakteri dari peptida sebagai antimikroba yang dapat menghancurkan membran normal. Pelepasan TTSS (*type III secretion system*) dari *Salmonella* normal ini merupakan kebutuhan *Salmonella* untuk bertahan hidup didalam makrofag. Fungsi sekresi protein tersebut belum diketahui dengan jelas, tetapi kemungkinan protein tersebut dapat menghalangi penggabungan antara fagosom dan lisosom. Sehingga bakteri dapat menghindari efek bakterisidal dari makrofag. Vakuola yang mengandung *Salmonella* ukurannya lebih besar dibandingkan dengan ukuran normal, hal ini

disebabkan karena terdapat suatu campuran bahan toksik dengan air. Pada umumnya enzim-enzim yang ada tidak aktif secara langsung beraksi dengan oksigen dan nitrogen bakteri. Sedangkan kemampuan beradaptasi dengan lingkungan dan makanan adalah hal yang penting. Metabolit gen biosintetik untuk sistesis "*de novo*", sebagai asam amino aromatik dan purin juga diinduksikan. Biasanya gen sel eukariotik yang melakukan invasi akan mengeluarkan kembali PhoP/PhoQ. Keduanya akan menginduksi pengeluaran gen yang penting untuk kekuatan mempertahankan kelangsungan hidup bakteri didalam makrofag untuk beradaptasi dengan lingkungan sekitarnya.

Salmonella memiliki dua *pathogenicity islands* yaitu SPI-1 dan SPI-2. SP-2 mengandung gen yang esensial untuk infeksi sistemik, replikasi intraseluler, dan TTSS (*type III secretion system*) yang melindungi bakteri dari proses fagositosis (Karlsson, 2004).

## 2.5 Fagositosis

Partikel, termasuk mikroorganisme, dan beberapa kompleks molekul yang dapat larut dalam darah, limf, dan jaringan sering ditelan oleh sel khusus dalam suatu proses yang disebut fagositosis. Sel fagosit yang utama adalah makrofag (fagosit berinti satu) dan granulosit (leukosit polimorfonuklir). Dua jenis sel fagosit ini kadang-kadang disebut "fagositosis profesional" untuk membedakannya dengan sel lain yang terkadang juga menelan partikel (misalnya fibroblas dan sel epitel). Fagositosis merupakan mekanisme

pertahanan tubuh yang penting dalam jaringan normal dan dalam reaksi radang (Brooks *et al.*, 1996).

#### **a. Imunitas berperantara sel**

Imunitas berperantara sel pada sebagian besar infeksi bakteri yang memberi resistensi dan membantu penyembuhan meskipun, meskipun kerjasama antibodi mungkin diperlukan. Selain itu imunitas berperantara sel penting dalam pertahanan terhadap parasit, tumor, dan sel asing (cangkakan). Bukti penting dari peranan imunitas berperantara sel berasal dari situasi klinis dimana penekanan imunitas ini misalnya AIDS mengakibatkan infeksi hebat atau tumor.

Sistem imun yang berperantara sel mencakup beberapa jenis sel dan hasil-hasilnya. Makrofag membawa antigen ke limfosit T. Reseptor sel T dan berbagai hormon mengenal antigen itu, dan klon sel T khusus diaktifkan dan mulai berkembang biak. Karena besarnya jumlah subpopulasi sel T dan interaksinya (langsung atau melalui produksi limfokin yang dapat larut) mengakibatkan sistem respons yang sangat kompleks, beberapa aspek dari sistem itu dibahas terpisah di bawah ini. Sel pembunuh alami (NK) hanya dijelaskan secara singkat sebab gambaran dan fungsinya yang jelas.

#### **b. Perkembangan sel T**

Dalam timus, sel progenitor sel T mengalami diferensiasi (dibawah pengaruh hormon timus) menjadi subpopulasi sel T. Pada tahun-tahun belakangan telah banyak dipelajari mengenai proses ini, dan ini masih

merupakan daerah penelitian aktif. Sel T berdiferensiasi dalam timus menjadi sel yang terlibat dalam pengekspresian reseptor sel T spesifik dan menjadi positif CD4 atau positif CD8. CD4 dan CD8 adalah protein permukaan sel yang menentukan subpopulasi utama sel T, sel T penolong (CD4) dan sel T sitotoksik (CD8). Sesudah diferensiasi di dalam timus, sel T mengalami proses seleksi yang mengakibatkan retensi hanya sel-sel tersebut dengan reseptor yang paling berguna, misalnya, yang merupakan spesifik antigen asing dan restriksi MHC sendiri. Klon ini yang berpotensi anti-diri atau dinonaktifkan fungsinya (dibuat *anergi*). Akibat dari proses seleksi adalah terdapat sekitar 95% timosit mati dalam timus. Hanya sedikit sel T berkembang yang mengekspresikan reseptor sesuai.

### c. Aktivasi sel T

Proliferasi sel T bergantung pada macam-macam peristiwa. Sel T istirahat harus menerima dua tanda untuk terjadinya aktivasi. Satu tanda datang dari reseptor sel T yang berinteraksi dengan kompleks antigen MHC yang tersaji pada sel lain. Pengenalan antigen memicu serangkaian jalur biokimiawi pada sel yang menimbulkan peristiwa sintesis dan mitosis DNA. Bentuk kritis peristiwa penandaan adalah protein kompleks CD3 yang berhubungan dengan rantai reseptor sel T. CD3 mentransduksi tanda untuk sitoplasma yang mengakibatkan peristiwa biokimia seperti peningkatan kadar  $Ca^{2+}$  sitoplasma, peningkatan aktivitas protein kinase C, fosforilasi protein untuk mengaktifkan faktor transkripsi, dan peristiwa transkripsi, sebagai contoh, gen reseptor IL-1 dan IL-2. Pelepasan IL-2

menimbulkan aktivasi sel T yang berhubungan dengan reseptor IL-2. Tanda pemisahan yang lain diperlukan untuk aktivasi sel T, dan hal itu datang dari interaksi antara molekul yang dikenal sebagai B7 yang ditemukan pada sel B dan makrofag dan pasangannya, CD8, pada sel T. Tanpa tanda yang kedua ini, pemaparan sel T terhadap antigen menyebabkan inaktivasi fungsinya atau kematian.

d. **Kategori utama sel T**

Sel-sel T dapat dimasukkan dalam dua kategori luas: sel CD4 dan sel CD8. Sel CD4 banyak terdapat dalam medula timus manusia, tonsil, dan darah, sementara sel darah CD8 banyak terdapat pada tulang sumsum manusia dan jaringan limfoid usus. Jumlah sel T yang khusus untuk satu antigen tunggal hanya sekitar 1 dalam  $10^5$ . Untuk mencapai reaktivitas imun, sedikit sel ini mengeluarkan limfokin yang dapat larut, yang mengaktifkan sejumlah besar limfosit lain.

Sel T merupakan 65-80% dari kelompok limfosit kecil yang beredar kembali. Masa hidupnya relatif panjang – beberapa bulan atau beberapa tahun.

- **Limfosit CD4:** Ini mencakup subpopulasi utama sebagai berikut.
  - Sel-sel penolong bagi sel B untuk berubah menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi.
  - Sel-sel penolong bagi T CD8 untuk menjadi matang secara fungsional dan mampu melakukan sitolitik.



- Sel-sel mengaktivasi makrofag berisi bakteri intraseluler, dengan cara demikian memyahkan sel-sel unuk menghancurkan bakteri.
- Sel-sel efektor untuk reaksi hipersensitivitas tipe lambat.
  - Limfosit CD8: Ini mencakup subpopulasi utama sebagai berikut:
    - Sel-sel sitotoksik yang dapat membunuh sel yang terinfeksi virus, sel tumor, dan sel alograf.
    - Sel-sel supresor, yang menghambat produksi antibodi dan reaksi hipersensitivitas lambat.

**e. Fungsi sel T**

Sel T mempunyai fungsi efektor serta fungsi pengaturan.

- **Fungsi efektor**

Reaksi imunitas berperantara sel dan reaksi hipersensitivitas tipe lambat terutama ditujukan untuk melawan antigen parasit intrasel, termasuk jamur, virus, beberapa protozoa, dan bakteri. Defisiensi imunitas berperantara sel menampilkan dirinya terutama sebagai keadaan yang sangat rentan terhadap infeksi oleh parasit dan terhadap tumor tertentu.

Dalam respons terhadap alograf atau tumor, sel positif-CD4 mengenali molekul MHC kelas II, selain antigen khusus, dan akan diaktifkan. Kemudian sel T sitotoksik positif-CD8 memberi respons terhadap produksi interleukin-2 (dan faktor dapat larut lain) dengan sel CD4, mengenal molekul MHC kelas I pada sel 'asing', dan mulai

bekerja untuk memusnahkan sel ini. Bila sel terinfeksi virus, limfosit CD8 harus mengenal antigen yang ditentukan virus maupun molekul MHC kelas I pada sel yang terinfeksi.

- **Fungsi pengaturan**

Sel T memainkan peranan penting dalam mengatur imunitas humoral (berperantara antibodi) maupun imunitas seluler (berperantara sel). Produksi antibodi oleh sel B biasanya membutuhkan keikutsertaan sel T penolong (respons yang bergantung pada sel T), tetapi antibodi terhadap beberapa antigen (misalnya makromolekul polimer seperti polisakarida sampai pada bakteri) adalah hasil respons tidak bergantung sel T. Dalam respons sel B yang bergantung sel T terhadap antigen, sel T dan B harus mempunyai kekhususan MHC kelas II yang sama.

Dalam respons yang bergantung sel T itu, antigen berinteraksi dengan IgM pada permukaan sel B. Kemudian ini diinternalisasi dan dimodifikasi. Fragmen antigen dikembalikan kepermukaan sel B bersama dengan molekul MHC kelas II. Ini berinteraksi dengan reseptor sel T penolong, yang memproduksi limfokin untuk meningkatkan pembelahan sel-sel B dan membuatnya berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi. Dalam respons berperantara sel, antigen diolah oleh makrofag dan fragmen dibawa bersama dengan molekul MHC kelas II pada permukaan makrofag. Ini berinteraksi dengan reseptor sel T pada sel T

penolong, yang memproduksi limfokin untuk merangsang pertumbuhan sel CD4 (sel T penolong) atau sel CD8 (sel T supresor). Limfokin yang penting secara ringkas diuraikan dibawah. Bila ada ketidakseimbangan dalam jumlah aktivitas sel CD4 dan CD8, berbagai mekanisme imun sel nyata sekali terganggu. Karena itu, pada AIDS, rasio normal sel CD4 terhadap sel CD8 ( $>1,5$ ) akan berubah. Beberapa sel CD4 dimusnahkan oleh HIV, sel CD4 lain bertindak sebagai penolong sel CD8 (supresor). Ini mengakibatkan peningkatan nyata dalam sel supresor CD8 dan rasio sel CD4, CD8 menjadi kurang dari 1, menyebabkan kerentanan ekstrem sehingga muncul banyak infeksi oportunistik dan tumor tertentu.

### 2.5.1 Reseptor untuk fagositosis

Fagositosis (penelanan partikel berukuran lebih dari  $4\mu\text{m}$ ) oleh makrofag dapat terjadi melalui tiga macam reseptor permukaan, yaitu (Greenberg & Silverstein, 1993) :

Reseptor spesifik

- Reseptor fraksi Fc dari imunoglobulin .

Reseptor ini selalu dalam keadaan aktif, sehingga makrofag istirahat dapat melakukan fagositosis partikel yang telah terliputi imunoglobulin spesifik.

- Reseptor komplemen.

Reseptor ini bersifat tidak aktif pada makrofag istirahat, dan baru diaktifkan bila ada aktivasi makrofag. Makrofag istirahat dapat mengikat partikel teropsonisasi komplemen, tapi tidak mampu memfagositnya, sedang makrofag teraktif dapat mengikat sekaligus memfagosit partikel teropsonisasi komplemen.

- Reseptor non spesifik

Reseptor tak spesifik yang mengikat partikel seperti lateks, agregat protein, hemosianin. Reseptor ini memungkinkan makrofag memfagosit antigen tanpa kehadiran imunoglobulin ataupun komplemen. Di antara reseptor yang memungkinkan fagositosis tak spesifik ini adalah reseptor mannose. Reseptor ini selalu dalam keadaan aktif, namun fagositosis dengan cara ini berjalan lambat dan kurang efisien pada sel istirahat. Pada makrofag teraktif, fagositosis melalui reseptor ini meningkat (Greenberg dan Silverstein, 1993).

### 2.5.2 Mekanisme fagositosis

Menurut Sujudi dkk, 1994, fagositosis makrofag berkaitan dengan fungsi utamanya dalam pertahanan tubuh, dan pelakunya adalah :

1. monosit, yang didalam jaringan menjadi makrofag
2. lekosit polimorfonukliar (PMN)

Kedua jenis sel (monosit dan PMN) berasal dari sel primitif sumsum tulang dimana sel tersebut umumnya sudah dewasa. Mekanisme fagositosis terdiri dari beberapa tahap yaitu :

- a. Kemotaksis
- b. Perlekatan
- c. Pencaplokan dan penghancuran mikroorganisme (ingesti dan destruksi)

**a. Kemotaksis**

Peranan utama sistem kekebalan bagi fagositosis ialah menarik PMN dan monosit ke tempat terjadinya interaksi antara antibodi atau limfosit kebal dengan mikroorganisme. Daya tarik terjadi oleh faktor kemotaksis yang dibebaskan limfosit T yang mengalami mitosis setelah terikat dengan antigen, atau terbentuk akibat kompleks antigen-antibodi mengikat komponen komplemen yang dapat terjadi baik melalui jalan klasik, maupun melalui jalan alternatif, atau oleh plasmin, tripsin, dan protease bakteri atau jaringan. Beberapa faktor ini dapat pula memperbesar permeabilitas kapiler, sehingga memungkinkan pasase antibodi dan sel ke daerah radang.

**b. Perlekatan**

Langkah pertama dalam fagositosis merupakan perlekatan mikroorganisme pada fagosit. Banyak bakteri patogen yang mampu menghindar (resisten) terhadap perlekatan ini, sehingga resistensi ini

merupakan faktor yang memperbesar virulensinya. Dalam hal ini diperlukan opsonisasi (*opsonin* berarti siap untuk dimakan).

Perlekatan terjadi melalui :

➤ Ikatan Fc

Monosit dan leukosit polimorf mempunyai reseptor untuk fragmen Fc dari sub kelas IgG tertentu yang terikat pada antigen (pada manusia IgG1 dan IgG3), tetapi tidak demikian halnya dengan subkelas lain dari IgG, IgM atau IgA. Jenis IgG tersebut, yang spesifik terhadap antigen mikroorganisme dapat mengikat mikroorganisme dengan fragmen Fc melekat pada fagosit. Dengan demikian terjadi perlekatan mikroorganisme pada fagosit.

➤ Ikatan C3

Monosit dan leukosit polimorf mempunyai reseptor untuk C3b yang aktif. Sehingga dengan adanya komplemen, kompleks mikroorganisme dengan antibodi pengikat komplemen menimbulkan opsonisasi. Opsonisasi demikian ini mungkin diperlukan terutama pada infeksi dini, dimana IgM terdapat dominan. Opsonisasi oleh C3b dapat juga terjadi melalui jalan alternatif yaitu oleh endotoksin bakteri. Hal ini terjadi pada tubuh yang belum memperoleh kekebalan spesifik.

➤ Proses *immune adherence*

Opsonisasi melalui pengikatan C3 dapat dihalangi oleh inaktivator C3b yang terdapat di dalam serum. Inaktivator C3b ini

melepaskan C3b dari mikroorganisme sebelum terjadi opsonisasi. Kompleks mikroorganisme antibodi yang terikat dengan C3 yang aktif dapat juga melekat pada eritrosit. Karena eritrosit terdapat dalam jumlah besar, maka kesempatan opsonisasi seluruh kompleks (mikroorganisme, antibodi, komplemen dan eritrosit) adalah lebih besar sebelum inaktivasi C3b terjadi. Ternyata mekanisme ini penting terhadap bakteri gram negatif dalam sirkulasi.

➤ Antibodi sitofilik terhadap makrofag

Berbeda dengan ikatan kompleks antigen-antibodi pada fagosit, antibodi sitofilik yang tidak terikat dengan antigen dapat menempel pada monosit atau makrofag (fagosit ini mempunyai reseptor untuk Fc antibodi tertentu). Bila antibodi bersangkutan homolog dengan antigen dari mikroorganisme, maka perlekatan mikroorganisme tersebut akan terjadi.

➤ Hambatan *aktivitas blokade* oleh produk bakteri

Komponen tertentu dari bakteri seperti protein M *Salmonella* dan protein A *stafilokokus* dapat menghambat perlekatan bakteri pada fagosit, walaupun ada opsonin. Aktivitas protein A berhubungan dengan daya ikatnya yang besar (afinitas) pada fragmen Fc IgG. Ikatan demikian ini menghambat opsonisasi (fragmen Fc telah diblokade). Dengan adanya antibodi spesifik

terhadap protein A stafilokokus, maka bakteri bebas dari hambatan opsonisasi, baik dengan IgG maupun oleh C3.

**c. Pencaplokan dan penghancuran mikroorganisme (ingesti dan destruksi)**

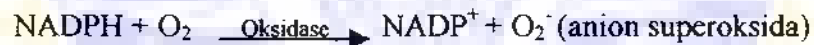
Setelah mikroorganisme melekat pada fagosit, maka pseudopodia direntangkan mengurung mikroorganisme tersebut, dengan membentuk suatu vesikel didalam sel (fagosom). Fagosom ini kemudian bergabung dengan vesikel lisosom dalam sitoplasma menjadi fagolisosom. Di dalam fagolisosom mikroorganisme mati dan dihancurkan melalui mekanisme yang tergantung pada oksigen dan mekanisme yang tidak tergantung pada oksigen. Dalam mekanisme yang tidak tergantung pada oksigen, termasuk pengaruh pH rendah dalam vakuola (pH4 di dalam sel polimorf), lisosim, protein kationik granuler, proteosa, lipasa dan glikosidasa. Lisosim sendiri bersifat melisis beberapa jenis mikroorganisme, tetapi juga dapat memperbesar efek mikrobasisd mekanisme lain. Protein kationik granuler hanya terdapat pada lekosit polimorf. Pada percobaan *in vitro* zat ini mempunyai efek bakterisid yang besar. Mekanisme yang tergantung oksigen terjadi oleh adanya peroksidase intraseluler. Peroksida secara langsung mempunyai efek mikrobasisd atau efek mikrobasisd diperoleh melalui pembentukan gugus-gugus reaktif, seperti hidroksil reaktif (OH<sup>•</sup>), dan oksigen tunggal reaktif (O<sup>•</sup>), dan anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).



Menurut Roitt, 2002 dalam *Essential immunologi* terjemahan Alida Harahap et al., sebagai berikut :

- **Pembunuhan bakteri dengan perantaraan oksigen reaktif.**

Kesulitan bagi bakteri penyerbu terjadi sejak saat fagositosis dimulai. Terjadi peningkatan yang mencolok dalam hal kegiatan *hexose monophosphate shunt* yang membangun NADPH. Elektron-elektron ke luar dari NADPH menuju flavoprotein membran yang mengandung FAD dan selanjutnya menuju ke suatu *sitokrom* membran plasma yang khas (*cytb<sub>558</sub>*). Ini mempunyai *midpoint redox potential* yang sangat rendah yakni -245 mV yang memungkinkan elektron untuk mengurangi oksigen molekuler langsung menjadi anion superoksida. Jadi reaksi kunci yang dikataliser oleh oksidase NADPH yang memulai terbentuknya *reactive oxygen intermediates* (ROI) adalah sebagai berikut :



Anion superoksida mengalami konversi menjadi hidrogen peroksida dengan pengaruh dismutase superoksida, dan selanjutnya menjadi radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ). Masing-masing produk ini mempunyai reaktivitas kimiawi yang luar biasa dengan kisaran yang luas terhadap sasaran-sasaran molekuler membuat mereka menjadi agen mikrobisidal yang kuat,  $\cdot\text{OH}$  secara khusus diketahui sebagai satu-satunya radikal bebas yang paling reaktif. Lebih jauh, gabungan dari peroksida, myeloperoksidase dan ion-ion halogen menyusun suatu sistem yang kuat berkemampuan membunuh bakteri maupun virus. Walaupun  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan komponen-komponen

halogenasi tidak seaktif seperti radikal bebas, mereka lebih stabil dan karenanya berdifusi lebih jauh, membuat mereka toksik terhadap mikroorganisme dilingkungan ekstraseluler.

- **Pembunuhan bakteri dengan perantara nitrogen reaktif.**

Oksida nitrat membuktikan diri secara menonjol sebagai suatu zat perantara fisiologis saat ditunjukkan serupa dengan *relaxing factor* yang berasal dari endotelium. Hal ini membuktikan satu peran di antara banyak peran (termasuk perantara terjadinya ereksi penis), namun yang menjadi perhatian utama dalam hal ini adalah pembentukannya di dalam makrofag dan mungkin didalam netrofil-netrofil manusia sehingga menghasilkan sistem antimikrobia yang kuat. Mekanisme kerja mungkin melalui degradasi kelompok tambahan Fe-S dari enzim-enzim pembawa elektron dan mungkin juga oleh pembentukan radikal-radikal ( $\cdot\text{OH}$ ).

- **Pembunuhan bakteri dengan bentuk jadi antimikroba.**

Molekul-molekul ini, yang berada di dalam granula-granula polimorf, mengadakan kontak dengan mikroorganisme yang telah tercerna saat terjadi difusi dengan fagosom. Superoksida yang tidak berubah akan menggunakan hidrogen dan meningkatkan pH vakuola secara perlahan-lahan sehingga membuka kesempatan kelompok-kelompok protein kationik dan peptida berfungsi secara optimal. Yang terakhir, dikenal sebagai defensin, kira-kira 3,5 – 4 kDa sangat kaya arginin, dan mencapai konsentrasi yang luar biasa tingginya di dalam fagosom, berkadar 20 – 100

mg/ml. Seperti kolisin bakteri yang telah diuraikan di atas, mereka mempunyai suatu struktur amfipatik yang memungkinkan mereka masuk kedalam membran mikroba untuk membentuk saluran-saluran ion yang bertegangan kurang stabil. Peptida-peptida antibiotik ini bertindak sebagai desinfektan terhadap suatu spektrum luas dari bakteri Gram positif dan negatif, berbagai banyak jamur dan sejumlah virus yang berselaput. Banyak yang menunjukkan selektifitas yang luar biasa terhadap mikroba-mikroba prokariotik dan eukariotik yang lebih besar dibandingkan sel-sel tuan rumah sebagian proses bergantung dari komposisi lemak. Tentu akan terkesan akan kemampuan istimewa alat sederhana yang mampu membedakan sel-sel yang bukan milik tuan rumah, misalnya mikroba dari diri kita sendiri. Apabila ini tidak cukup, kerusakan lebih lanjut terjadi pada membran bakteri oleh kerja proteinase netral (cathepsin G) dan pemindahan protein secara langsung ke permukaan mikroba yang meningkatkan permeabilitas bakteri. pH yang rendah, lisosim dan laktoferin menyusun faktor-faktor bakterisidal dan bakteriostatik yang tidak tergantung pada oksigen dan dapat berfungsi di bawah kondisi anaerobik. Akhirnya organisme yang telah terbunuh dicerna oleh enzim hidrolitik dan produk-produk yang mengalami degradasi dilepas ke luar. Namun ada beberapa hambatan yang perlu dipertimbangkan kehebatan antimikrobal sel-sel fagosit menjadi tidak berfungsi bila fagosit tidak dapat (i) kembali mengatur posisi terhadap mikroorganisme, (ii) melekat kepadanya, dan (iii) bereaksi melalui aktivasi membran yang merintis

proses penelanan. Beberapa bakteri menghasilkan substansi-substansi kimiawi seperti peptida *formyl.met.leu.phe* yang secara langsung menarik lekosit-lekosit, suatu proses yang dikenal sebagai kemotaksis, beberapa organisme melekat pada permukaan fagosit dan yang lainnya melekat secara spontan mempersiapkan membran terikat sebagai sinyal pertama. Kemudian mikroba musuh melakukan mutasi secara berkesinambungan menghasilkan spesies baru yang dapat menipu pertahanan sehingga tidak terjadi apa-apa. Tubuh menyelesaikan masalah-masalah ini melalui evolusi beberapa juta tahun dengan dikembangkannya sistem komplemen.

### **2.5.3 Metode penilaian aktivitas fagositosis secara *in vitro*.**

Beberapa syarat yang menjadi dasar untuk aktivitas fagositosis secara *in vitro* yaitu :

- a. Terdapatnya populasi sel.
- b. Terdapatnya partikel.
- c. Terdapatnya faktor opsonisasi.
- d. Dan kondisi lingkungan yang baik dan sesuai.

Untuk memastikan bahwa telah terjadi ingesti pada partikel dapat diketahui dengan bermacam-macam metode. Metode ini harus memenuhi beberapa kriteria antara lain :

1. Harus dapat membedakan partikel yang terletak didalam dan diluar sel.
2. Tidak terdapat partikel didalam sel pada waktu ke nol atau sebelum reaksi dimulai.

3. Partikel mulai diingesti pada jangkauan derajat kinetik ordo nol, dengan rasio sel yang mengalami peningkatan.

Metode yang digunakan untuk mempelajari proses fagositosis harus memenuhi kriteria diatas. Metode ini dibagi dalam dua grup yaitu metode intraseluler dan ekstraseluler. Pada metode intraseluler terjadi peningkatan jumlah partikel yang diingesti secara teratur, sedangkan metode ekstraseluler terjadi penurunan jumlah partikel yang diingesti secara teratur (Leijh *et al.*,1986).

Jumlah partikel yang diingesti oleh fagosit dapat ditetapkan dengan menggunakan mikroskop cahaya dan atau elektron, dengan demikian dapat dibedakan dengan jelas partikel ekstra dan intraseluler. Pada metode mikroskop cahaya, digunakan xylol untuk melarutkan partikel lateks yang berada didalam sel. Air atau larutan *ammonium chloride* digunakan untuk melisiskan sel darah merah atau *lysostaphin* yang ditambahkan untuk melisiskan *S. aureus*.

Proses fagositosis yang diamati dengan metode mikroskopik bergantung pada waktu, data yang reliabel, dan kinetika fagositosis. Penetapan nilai dan kinetika proses fagositosis pada metode ini, menggunakan rasio fagositosis, interval waktu, dan temperatur. Metode ini menggunakan partikel yang dilabel dengan fluoresen atau radioaktif, partikel lateks atau *oil droplets*. Penghitungan jumlah partikel yang dilabel harus dilakukan dengan cepat. Karena metode ini dipengaruhi oleh aktivitas partikel yang dilabel dan ukuran partikel yang rendah atau tinggi.

... untuk peneleapan partikel lateks ekstraseluler atau *oil droplets* secara kuantitatif, bahan yang digunakan harus berasal dari ekstrak sel fagosit. Untuk mendapatkan bahan tersebut harus dilakukan penghancuran sel lekosit. Oponisasi dilakukan dengan menggunakan antibodi atau komplemen yang berguna untuk mengoptimalkan ingesti mikroorganisme. Hal ini relevan dengan ilmu kinetika fagositosis yang menggambarkan keadaan pada saat terjadi infeksi, *i.e* dengan menggunakan mikroorganisme hidup, antibodi spesifik, dan atau aktivasi dari komplemen.

## 2.6 Imunoasai Berlabel Fluoresens

Imunoasai adalah suatu cara pemeriksaan untuk mengukur derajat imunitas atau kadar antibodi atau antigen dalam cairan tubuh atau serum seseorang, sedangkan ilmu yang mempelajari reaksi antigen dan antibodi *in vitro* disebut serologi. Sedangkan fluorensen sendiri menyangkut beberapa hal yang terkait dengannya. Bila suatu molekul menghisap energi dari suatu radiasi, elektronnya dapat didistribusikan kembali sehingga membangkitkan keadaan tereksitasi.

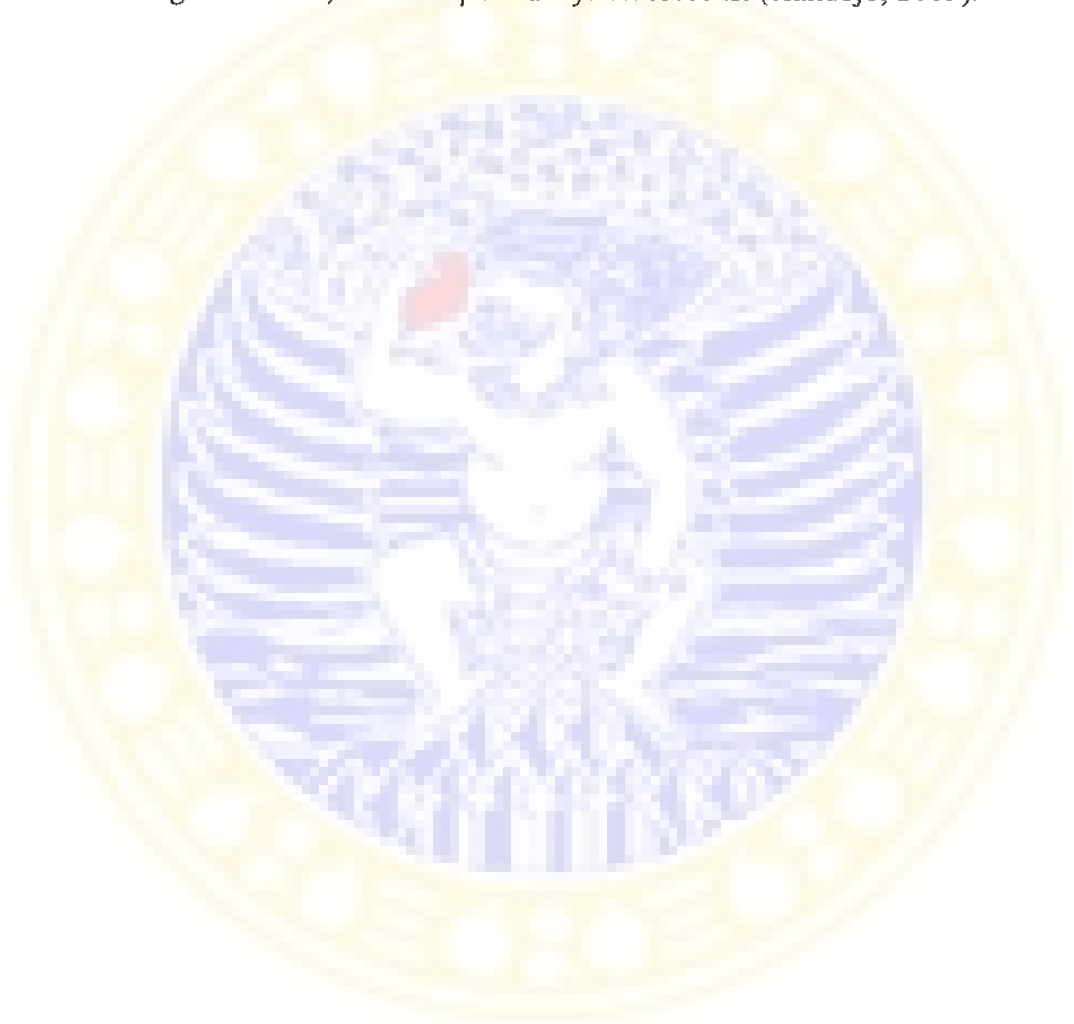
Energi ekstra tersebut pada beberapa molekul, tidak dilepaskan ke molekul sekitarnya, namun dipancarkan sebagai cahaya, bila beberapa elektron tersebut kembali ke keadaan awal. Radiasi yang dipancarkan dalam bentuk cahaya ini disebut Fluoresens. Energi eksitasi dapat diabsorpsi dari foton cahaya dengan panjang gelombang tertentu.

Cahaya yang dipancarkan mempunyai energi yang lebih rendah sehingga memiliki panjang gelombang yang lebih besar daripada sinar yang diserap oleh karena sebagian energi sebagian hilang sebelum dipancarkan. Perbedaan antara puncak panjang gelombang sinar eksitasi dan fluoresens disebut pergeseran Stokes (*Stokes shift*). Pergeseran Stokes yang luas, akan memberikan perbedaan yang lebih nyata dan pelacakan yang lebih tepat. Tolok ukur yang penting dari fluoreses adalah efisiensi kuantum (*quantum efficiency*) yaitu bagian dari jumlah kuantum sinar terabsorpsi yang dipancarkan sebagai sinar fluoresens. Efisiensi kuantum biasanya kurang dari satu oleh karena sebagian energinya hilang. Bila efisiensi kuantum mendekati satu menunjukkan bahwa efisiensinya telah maksimal. Molekul atau bahan yang dapat mengabsorpsi energi dari suatu radiasi disebut fluorofor (*fluorophore*)(Handojo, 2003).

Dalam penelitian ini yang digunakan sebagai label dalam uji immunoasai fluoresens adalah *Fluorescein isothiocyanate* dengan teknik tak langsung (*IFA*), yang secara kimiawi stabil, mempunyai efisiensi kuantum 90%, dengan jarak pergeseran Stokes sepanjang 26 nm dan dengan waktu hidup fluoresens selama 5 nano detik. Fluoresensinya berwarna hijau apel. Waktu hidup fluoresens dari suatu fluorofor adalah waktu yang dibutuhkan oleh fluorofor tersebut untuk menghilang dari penglihatan bila tidak ada energi eksitasi lagi.

Uji imunofluoresens tak langsung, pada uji ini antigen yang telah diketahui difiksasi pada suatu *template* lalu ditambahkan beberapa tetes

serum homolog (antibodi penderita). Setelah diinkubasikan, *template* dicuci dan ditambah *antihuman globulin* berlabel *fluorescein* (konjugat). Setelah waktu inkubasi, *template* dicuci, diambil 10  $\mu$ l diletakkan diatas *slide* dilihat dibawah mikroskop Fluoresens. Bila dalam serum terdapat antibodi terhadap antigen tersebut, akan tampak adanya fluoresensi (Handojo, 2003).







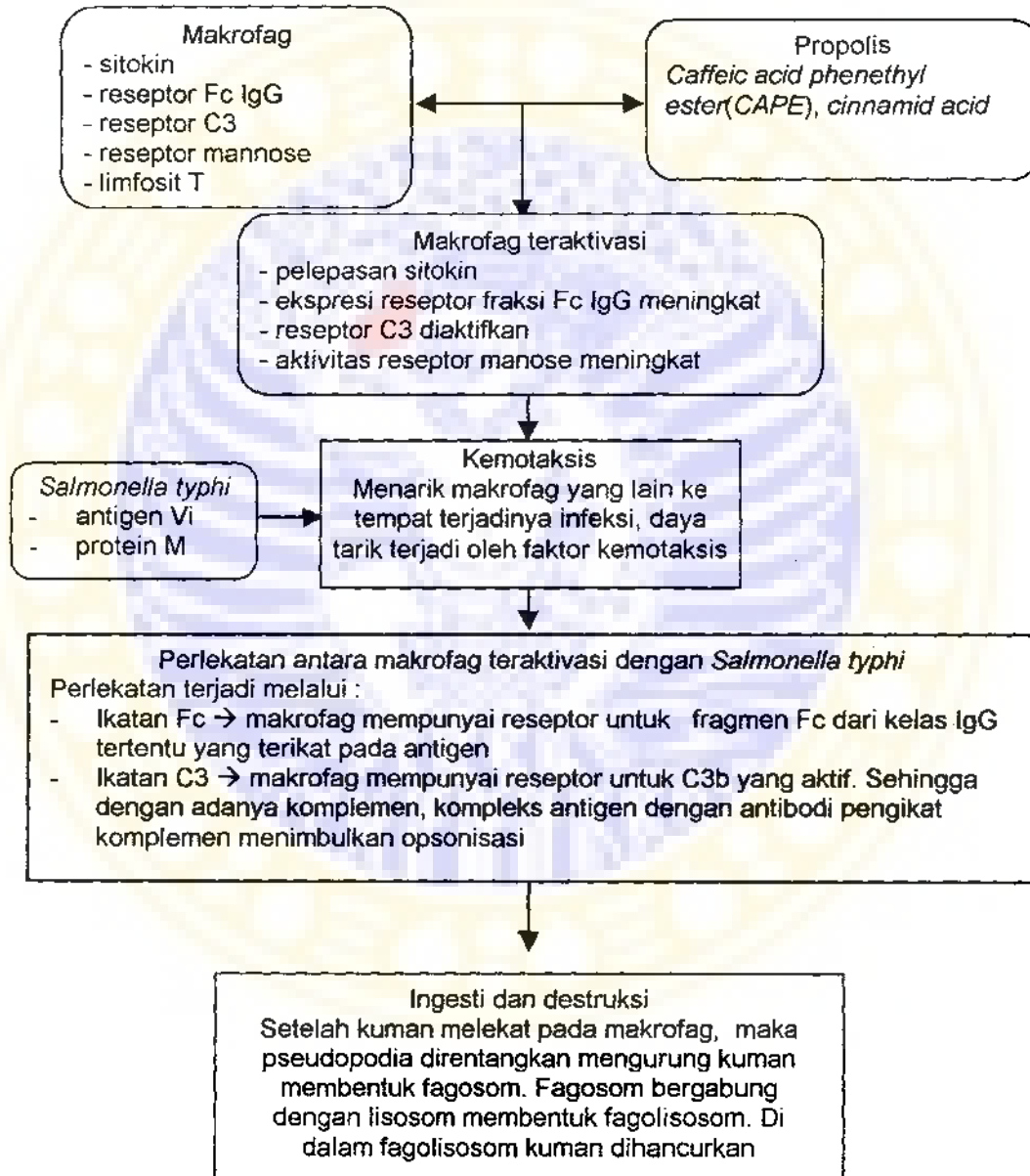
## BAB 3

# KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### BAB 3

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Makrofag merupakan salah satu komponen sistem imun yang dapat melepaskan sitokin dan mempunyai beberapa faktor reseptor antara lain reseptor fraksi Fc IgG, reseptor C3, reseptor manosa dan reseptor yang lain. Makrofag juga dapat bertindak sebagai sel penyaji antigen protein (*antigen-presenting cell/ APC*) dipermukaannya agar dikenali oleh limfosit T. Makrofag juga memproduksi protein yang meningkatkan aktivasi limfosit T (IL-1) (Abbas *et al.*, 2001). Limfosit T teraktivasi ini yang terutama memulai perlawanan tubuh terhadap mikroorganisme intraseluler yang beredar dalam limpa, kelenjar getah bening, plaque Peyeri, dan darah (Sujudi dkk., 1994). Sedangkan propolis merupakan suatu bahan yang terdapat dalam jumlah banyak di alam. Menurut Orsi *et al.*, 2000 di dalam propolis terkandung bahan yang terbukti sebagai imunomodulator seperti *caffeic acid penethyl ester/ CAPE* dan *cinnamid acid* yang berupa unsur organik dan mineral (semua vitamin dan garam galian yang diperlukan), bahan ini dapat dianalogkan dengan beberapa sifat makrofag yang diaktifkan oleh LPS. Jika makrofag dicampur dengan propolis maka akan terjadi aktivasi makrofag. Sebagai tanda bahwa makrofag sudah teraktivasi terdapat peningkatan ekspresi reseptor fraksi Fc IgG, pengaktifan reseptor C3, peningkatan aktivitas reseptor manosa dan pelepasan sitokin, yang akan meningkatkan aktivitas fagositosis. Dalam kondisi makrofag teraktivasi bila ditambahkan *Salmonella typhi* sebagai bakteri intraseluler yang patogen pada manusia, maka segera akan terjadi proses fagositosis yang diawali dengan proses kemotaksis. Pada proses kemotaksis ini

makrofag yang teraktivasi akan melepaskan sitokin. Sitokin ini berguna untuk menarik makrofag ke tempat terjadinya infeksi, daya tarik terjadi oleh faktor kemotaksis yang dibebaskan limfosit T yang mengalami mitosis setelah terikat dengan antigen, atau terbentuk akibat kompleks antigen antibodi mengikat komponen komplemen yang dapat terjadi melalui jalan klasik maupun jalan alternatif (Sujudi dkk., 1994). Setelah terjadi proses kemotaksis, maka terjadi perlekatan antara makrofag teraktivasi dengan bakteri *Salmonella typhi*. Sedangkan perlekatan tersebut terjadi melalui ikatan Fc yaitu ikatan reseptor untuk fragmen Fc dari kelas IgG tertentu yang terikat pada bakteri *Salmonella typhi*. Perlekatan terjadi juga pada ikatan C3 yaitu ikatan komplemen. Sehingga dengan adanya komplemen, kompleks antigen dengan antibodi pengikat komplemen menimbulkan opsonisasi. Proses fagositosis diakhiri dengan peristiwa ingesti dan destruksi oleh makrofag. Setelah bakteri melekat pada makrofag yang sudah teraktivasi, maka pseudopodia direntangkan mengurung bakteri membentuk fagosom. Fagosom bergabung dengan lisosom membentuk fagolisosom. Di dalam fagolisosom ini bakteri dihancurkan dengan bantuan enzim proteolitik.

Dengan demikian dapat diharapkan bahwa fungsi makrofag, khususnya fungsi utama sebagai fagosit profesional juga meningkat. Meski menurut Wing & Remington (1978) dan Dissel (1987) peningkatan fungsi makrofag teraktivasi tidak bersifat "all in one", namun Werb (1982) serta Greenberg dan Silverstein (1993) menyatakan bahwa pada umumnya

fungsi makrofag teraktivasi meningkat, khususnya fungsi fagositosis dan pembunuhan intraseluler (*intracellular killing*) yang merupakan fungsi utama makrofag. Peningkatan fagositosis dimungkinkan karena meningkatnya jumlah reseptor fraksi Fc dari IgG, diaktifkannya reseptor komplemen, serta meningkatnya aktivitas reseptor fagosit non spesifik (reseptor mannosa). Sedang peningkatan kemampuan bakterisidal intraseluler terjadi karena peningkatan produksi oksigen reaktif (pada makrofag manusia) atau nitrogen reaktif (pada makrofag mencit).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian propolis dapat meningkatkan kemampuan fagositosis intraseluler *Salmonella typhi* dari makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c secara *in vitro*.
2. Lama waktu paparan antara makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c dengan bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro* berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis intraseluler.
3. Ada intersepsi atau interaksi pemberian propolis terhadap aktivitas fagositosis intraseluler dari makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c dengan bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro* dalam interval waktu tertentu.



## BAB 4

# MATERI DAN METODE PENELITIAN

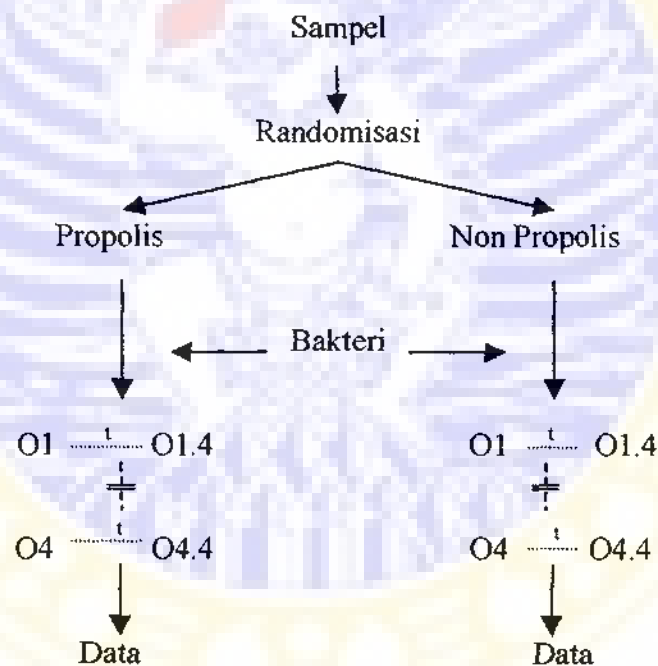
## BAB 4

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental (laboratorik) sesungguhnya dengan rancangan *Faktorial (2x4)*. Faktor pertama adalah penambahan propolis, sedang faktor kedua adalah waktu pengamatan.

##### 4.1.1 Uji Fagositosis In Vitro



Keterangan : O1 .....<sup>1</sup>..... O1.4 = Pengamatan pada tabung pertama setiap 30, 60, 90, 120 menit.

O4 .....<sup>1</sup>..... O4.4 = Pengamatan pada tabung keempat setiap 30, 60, 90, 120 menit.

## 4.2 Kriteria dan Ukuran Sampel

Untuk uji fagositosis *in vitro* sampel yang digunakan adalah makrofag peritoneal dari mencit jantan umur 6 sampai 8 minggu, strain BALB/c, sehat, berat badan  $\pm$  30 gram, berjumlah 10 ekor (Orsi *et al.*, 2000) yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Universitas Airlangga Surabaya. Makrofag mencit dibagi secara acak menjadi 2 kelompok, yaitu : kelompok makrofag yang tidak diberi propolis dan kelompok makrofag dengan pemberian propolis. Jumlah ulangan ditentukan dengan rumus (Sutjihno, 1986):

$$\begin{aligned}(p-1)(u-1) &\geq 15 \\(8-1)(u-1) &\geq 15 \\7(u-1) &\geq 15 \\7u-7 &\geq 15 \\7u &\geq 15+7 \\u &\geq 22/7 \\u &\geq 3,14\end{aligned}$$

Keterangan : p = Perlakuan

u = Ulangan

Karena hasil  $u \geq 3,14$  maka untuk ulangan dibulatkan menjadi 4 ulangan.

## 4.3 Variabel Penelitian

### 4.3.1 Uji fagositosis *in vitro*

- a. Variabel bebas adalah dosis propolis sebanyak (0 dan 0,7 $\mu$ l).
- b. Variabel tergantung terdiri dari jumlah makrofag yang memfagosit bakteri, jumlah rata-rata bakteri yang difagosit oleh makrofag yang melakukan fagositosis serta indeks fagositosis.



lebah. Lebah membuat propolis tersebut dengan mengumpulkan getah resin dari pohon-pohon dan mencampurnya dengan nectar dan membentuk substansi wax sebagai sarangnya. Propolis ini digunakan oleh lebah sebagai alat perlindungan dari kontaminasi luar dan pintu masuk kedalam sarang untuk mensterilkan mereka saat keluar masuk sarang.

- d. Fagositosis adalah serangkaian proses yang diawali dengan pengenalan dan perlekatan oleh suatu reseptor makrofag dan diakhiri dengan penghancuran bakteri oleh fagolisosom didalam makrofag. Kemampuan fagositosis dinyatakan dengan persentase makrofag yang memfagosit yang diamati secara sistematis, serta indeks fagosit (perkalian jumlah makrofag yang mengandung bakteri dengan rata-rata jumlah bakteri per makrofag) (Bishayi, 2000), dihitung pada mikroskop fluoresen dengan pengecatan ganda (*double staining*) agar dapat dibedakan bakteri yang benar-benar ditelan dengan bakteri yang hanya melekat pada permukaan makrofag. Bakteri yang tertelan akan berwarna hijau sedang bakteri yang hanya menempel pada permukaan makrofag berwarna oranye.
- e. Efektifitas propolis adalah kemampuan propolis untuk meningkatkan aktifitas fagositosis dari peritoneal makrofag, bila propolis ditambahkan kedalam makrofag, maka makrofag akan meningkatkan aktivitas fagositosisnya sebesar 2,65 bila dibandingkan dengan makrofag yang tidak ditambahkan propolis.

#### 4.4 Alat Dan Bahan Penelitian

##### 4.4.1 Alat yang digunakan :

1. kapas, alkohol, dan betadin untuk desinfeksi
2. spuit 10cc
3. peralatan operasi
4. kateter intra vena no 23
5. tabung sentrifus polipropilen 50cc dan 10cc
6. sentrifus
7. bilik hitung Improved Neubauer
8. pipet lekosit
9. cawan petri
10. tabung reaksi 15ml
11. ose
12. *water bath*
13. mikropipet
14. mikroskop fluoresen

##### 4.4.2 Bahan-bahan penelitian

1. propolis gold 20% dalam bentuk cairan siap uji
2. *phosphat buffered saline/ PBS*
3. medium RPMI 1640
4. serum mencit homolog

6. larutan tripan biru untuk mengetahui viabilitas sel
7. standar Mc Farland
8. FITC
9. isolat bakteri *Salmonella typhi* yang didapat dari Balai Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya
10. NaHCO<sub>3</sub> 0,1M (pH 9)
11. ethidium bromide 50µg/ml
12. es batu

#### 4.5 Lokasi Dan Waktu Penelitian

##### 4.5.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga, Balai Laboratorium Kesehatan Daerah Surabaya dan Poltekkes Jurusan Analis Kesehatan Surabaya.

##### 4.5.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2003 sampai dengan bulan September 2004, dengan jadwal sebagai berikut :

Kegiatan	Bulan Pelaksanaan /Th 2003-2004									
	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Studi kepustakaan	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Penulisan dan sidang proposal		X	X							
Penelitian pendahuluan						X				
Penelitian sesungguhnya									X	
Penulisan dan sidang tesis										X X

## 4.6 Prosedur Pemeriksaan dan Pengumpulan Data

### 4.6.1 Persiapan propolis

Propolis yang digunakan pada penelitian ini adalah propolis gold siap uji dengan dosis 20%. Menurut Orsi *et al.*, (2000) dalam percobaannya, pelepasan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh makrofag peritoneal saat berlangsung proses fagositosis yang paling efektif adalah propolis dengan dosis 10 µg/ml. Oleh karena itu propolis gold dengan dosis 20% tersebut dilakukan pengenceran.

Dengan cara sebagai berikut:

- a. Kita timbang 1 ml propolis 20% (1ml propolis 20% sebanding dengan berat 0,812 gram. Dosis 1 ml dalam propolis 20% adalah sebanding dengan 162.400 µg/ml).
- b. Diencerkan dengan aquadest untuk injeksi sampai 10 ml (sehingga didapat dosis 162.400 µg dalam 10 ml).
- c. Diambil 0,7 µl ditambahkan kedalam suspensi makrofag.

0,7 µl dari persamaan :

$$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$$

$$10 \cdot 162.400 \mu\text{g} = V2 \cdot 10 \mu\text{g}$$

$$V2 = 0,7 \mu\text{l}$$

#### 4.6.2 Persiapan makrofag

- a. Mencit dalam keadaan sehat, diinjeksikan 10 ml PBS kedalam rongga peritonium. Peritonium dipijit-pijit selama 1 menit, kemudian dilakukan anestesi terhadap mencit dengan pemberian eter sebelum dilakukan pembedahan pada peritonium.
- b. Cairan peritoneum diambil dengan kateter intra vena no 23 dan dimasukkan ke tabung polipropilen. Selanjutnya disentrifus 110 x g selama 4 menit pada suhu 0°C dan supernatannya dibuang.
- c. Sedimen diberi media kultur sel yaitu RPMI 1640 yang mengandung *L-glutamine* dan 10 % serum homolog, dihitung jumlahnya dan ditentukan viabilitasnya dengan tripan biru pada bilik Improved Neubauer. Selanjutnya sel disuspensikan kedalam medium dengan konsentrasi  $1 \times 10^7$ /ml. Untuk makrofag yang mendapat perlakuan, kedalam medium RPMI ditambahkan 0,7µl propolis yang sudah diencerkan 10 kali dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan CO<sub>2</sub> 5% sebelum dilakukan fagositosis intraseluler.

#### 4.6.3 Persiapan bakteri untuk uji fagositosis

##### a. Isolasi bakteri *Salmonella typhi*

Isolasi bakteri *Salmonella typhi* menggunakan sampel darah yang telah dilakukan tes widal dengan hasil O positif titer diatas 1/320.

Hari pertama :

1. Darah sebanyak 2 – 3 ml dimasukkan kedalam 10 ml empedu pepton.
2. Kocok baik-baik, masukkan inkubator 37°C 1 – 7 kali 24 jam.

Hari kedua :

3. Pertumbuhan didalam empedu pepton (*Gall cultur*) ditanam pada media isolasi Mac Conkey dan Salmonella Shigella Agar (atau EMB, ENDO, BSA, DCA, *Hectoen enteric agar*, XLD agar. Boleh digunakan 2 atau 1 macam saja).
4. Masukkan inkubator 37°C 24 jam. Pada media isolasi Mac Conkey dan Salmonella Shigella Agar akan tampak koloni tidak berwarna, jernih keping, bulat kecil atau sedang, smooth. Penanaman ini diulangi pada hari ke 4 dan ke 7.

Hari ketiga :

5. Koloni yang tersangka dimedia isolasi ditanam pada media TSI agar, SIM medium dan Simmon's citrate agar.
6. Masuk inkubator 37°C 24 jam. Untuk *Salmonella typhi* pada media TSI agar akan tampak pada lereng : alkalis (merah), dasar : asam (kuning), gas : - (negatif), H<sub>2</sub>S : + (positif).

Hari keempat :

7. Pertumbuhan pada media TSI agar, SIM medium dan Simmon's citrate agar dilanjutkan dengan uji biokimia dan ditanam pada Nutrien Agar Slant (NAS).

8. Dimasukkan inkubator 37<sup>0</sup>C 24 jam. Hasil uji biokimia pada media gula-gula : glukosa : +, laktosa : -, manosa : +, maltosa : +, sukrosa: -, Indol : -, MR/VP : +, Citrat : -, Urea : -, Motil : +.
9. Pertumbuhan pada NAS dilakukan uji aglutinasi dengan serum polyvalent, kalau positif dilanjutkan dengan serum monovalent.
10. Pada medium NAS ditambah larutan garam fisiologis steril, untuk melarutkan koloni bakteri, sehingga didapatkan larutan stok bakteri. Dari larutan stok bakteri ini dilakukan pengenceran disesuaikan dengan standar Mc Farland.

**Mc Farland nephelometer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> standards**

- a. BaCl<sub>2</sub> 1% cair + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cair.
- b. Tambahkan jumlah ke dua cairan tersebut seperti tertulis pada tabel kedalam tabung tabung bersih dan kering. Diameter masing –masing tabung harus sama.
- c. Tutup rapat-rapat dan beri tanda.
- d. Simpan dalam lemari es.

Tabel 4.1 Standar Mc Farland

Tabung	BaCl <sub>2</sub> 1% per ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% per ml	Perkiraan kepadatan bakteri dalam juta per ml
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1	9	3000

**b. Persiapan bakteri untuk uji fagositosis**

1. Isolat *Salmonella typhi* dari medium Nutrien Agar Slant sebagai stok kuman, dibuat suspensi dengan PBS disesuaikan dengan standar McFarland 1. Larutan standar McFarland 1 sesuai dengan kepadatan bakteri  $3 \times 10^8$  CFU/ml
2. Bakteri yang telah disuspensikan dalam PBS dengan konsentrasi  $3 \times 10^8$  CFU/ml dan diinaktifkan dengan pemanasan  $56^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit.
3. Bakteri diopsonisasi dengan komplemen dan inkubasi dalam PBS yang mengandung 20 % serum homolog pada  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit (Bishayi, 2000). Proses opsonisasi ini terjadi pada saat bakteri dilabel *fluorescein isothiocyanate* (FITC) menggunakan teknik *indirect fluorescent antibody* (IFA) (Forbes *et al.*, 2002)



**c. Pengujian fagositosis**

1. 100  $\mu\text{l}$  sel makrofag ( $1 \times 10^6$ ) dicampur dengan 100  $\mu\text{l}$  bakteri ( $3 \times 10^7$ ) berlabel fluoresens yang sudah teropsonisasi dalam tabung *polypropylene* dan ditambah 800  $\mu\text{l}$  medium RPMI yang mengandung 10 % (konsentrasi akhir) serum mencit (Vray, 1981). Tabung digoyang-goyang pelan dalam shaker pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama waktu yang ditentukan (30, 60, 90, 120 menit), kemudian disentrifus 75 X g selama 6 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  untuk menghentikan fagositosis dan memisahkan bakteri yang bebas dari sel makrofag.
2. Bakteri yang bebas (*free bacteria*) dibuang dengan mencuci sel sebanyak 2 kali dengan 2 ml PBS bersuhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Kemudian sel makrofag disuspensikan dalam RPMI bersuhu  $4^{\circ}\text{C}$  sehingga volumenya 1 ml.
3. Untuk membedakan bakteri yang terletak di dalam dan diluar sel, diambil 100  $\mu\text{l}$  preparat dan ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  Ethidium Bromide 100  $\mu\text{g/ml}$ .
4. Diambil 10  $\mu\text{l}$  aliquot, ditetaskan pada gelas obyek serta ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan dilakukan pada mikroskop fluoresen menggunakan filter 520 nm dengan pembesaran 400X. Bakteri yang difagosit adalah bakteri yang terletak intraseluler (berada dalam kontur sel dan nampak berfluoresensi hijau), sedang

bakteri dengan fluoresensi merah-oranye yang terletak di luar sel, atau melekat pada membran sel, tapi tidak difagosit.

5. Dilakukan penghitungan jumlah sel makrofag yang memfagosit bakteri secara sistematis dan rata-rata jumlah bakteri dalam makrofag yang melakukan fagositosis. Penghitungan harus dilakukan tidak lebih dari 20 menit sejak penetesan Ethidium bromide.

#### 4.7 Teknik Analisis Data

Analisis data menggunakan *Multivariate Test* dan *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5% (Sudjana, 1996).



## BAB 5

# ANALISIS HASIL PENELITIAN

## BAB 5

### ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Data Penelitian

Data penelitian didapatkan dengan menghitung jumlah makrofag yang melakukan fagositosis, jumlah bakteri yang terfagosit oleh makrofag dan nilai indeks fagositosis dalam waktu tertentu yaitu 30, 60, 90, 120 menit yang menunjukkan lama waktu paparan antara makrofag kelompok propolis dan non propolis dengan bakteri *Salmonella typhi*. Kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis datanya dengan menggunakan uji statistik *Multivariate Tests* dan *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5%

##### a. Persiapan propolis

Propolis gold dengan dosis 20% siap uji, setelah dilakukan pengenceran 10 kali berwarna seperti susu, dengan dosis 162.400 µg/10 ml. Diambil 0,7 µl dari pengenceran tersebut untuk mendapatkan dosis 10 µg/ml. Menurut Orsi *et al.*,(2000) dalam percobaannya, pelepasan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh makrofag peritoneal yang paling efektif adalah propolis dengan dosis 10 µg/ml. Dengan indikator pelepasan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menunjukkan bahwa proses fagositosis sedang berlangsung. Oleh karena itu dalam penelitian kali ini digunakan propolis dengan dosis yang sama yaitu dosis 10 µg/ml.

**b. Persiapan bakteri**

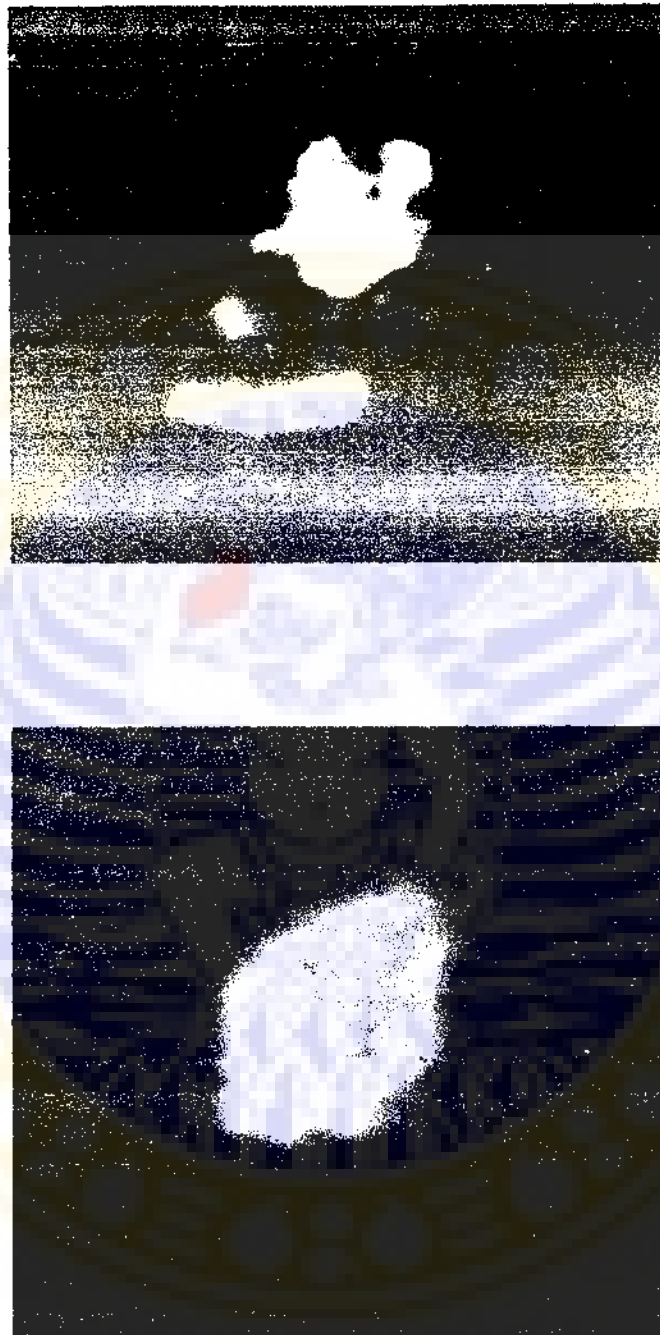
- a. Bakteri dalam biakan Nutrien Agar Slant (NAS) disuspensikan dengan NaCl 0,9% steril, hasil suspensi kemudian disamakan dengan standar Mc Farland 1 yang sesuai dengan kepadatan bakteri  $3 \times 10^8$  /ml. Sehingga didapatkan suspensi bakteri kepadatan bakteri  $3 \times 10^8$  /ml. Dari suspensi ini diambil 1 ml ditambah 2 ml PBS steril dan dinaktifkan dengan pemanasan  $56^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit. Kemudian dilakukan pelabelan bakteri dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC) menggunakan teknik *indirect fluorescent antibody* (IFA) yang menghasilkan warna fluoresensi hijau yang homogen (Forbes *et al.*, 2002).

**c. Persiapan makrofag**

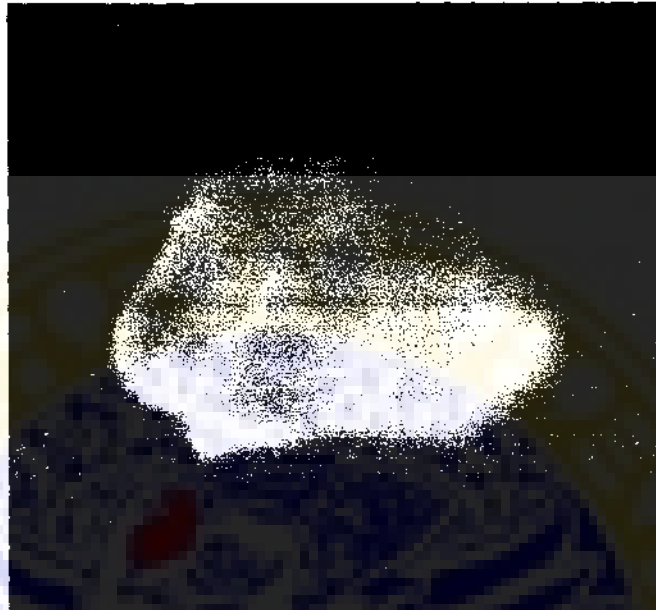
Dari 10 ekor mencit jantan sehat strain BALB/c berumur 10 minggu dengan berat badan rata-rata 30 gram diperoleh  $5 \times 10^6$  sel makrofag. Viabilitas makrofag diuji dengan tripan biru sebesar 95%.

**d. Uji fagositosis**

Pada pengamatan mikroskopi fluoresen dapat dibedakan bakteri yang telah difagosit (terletak intraseluler) berfluoresensi hijau dan bakteri yang tidak difagosit (terletak diluar dan menempel pada sel atau ekstraseluler) berfluoresensi merah-oranye.



**Gambar 5.1 Makrofag dengan bakteri intraseluler berwarna hijau. Pembesaran 400 kali pada mikroskop fluoresen.**



Gambar 5.2 Makrofag dengan bakteri ekstraseluler berwarna merah-oranye. Pembesaran 400 kali pada mikroskop fluoresen

## 5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

### a. Persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis.

Persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis terhadap bakteri adalah jumlah makrofag yang mengandung bakteri dibagi dengan jumlah seluruh makrofag yang ditemukan dalam lapangan pandang kali 100. Sehingga didapat rata-rata jumlah makrofag yang melakukan fagositosis dengan menjumlahkan nilai seluruh jumlah makrofag yang melakukan fagositosis dan membaginya dengan banyaknya pengulangan dalam kelompok waktu tertentu, seperti dalam tabel dibawah ini.

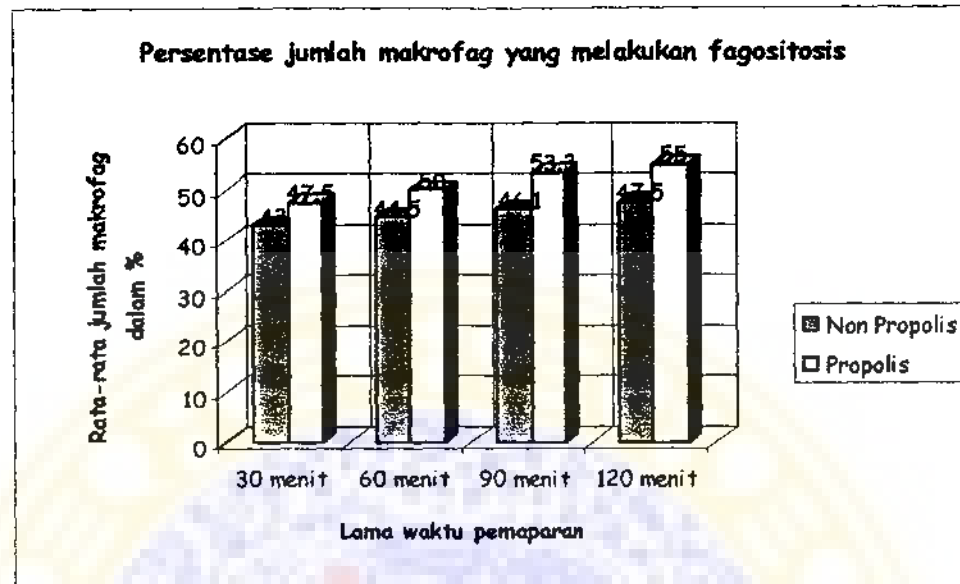
Tabel 5.1 Persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis

Waktu paparan	Rata-rata jumlah makrofag yang melakukan fagositosis dalam % ± SD	
	Non Propolis	Propolis
30 menit	43,0 % ± 0,41 <sup>a</sup>	47,5 % ± 0,01 <sup>d</sup>
60 menit	44,5 % ± 0,37 <sup>b</sup>	50,0 % ± 0,01 <sup>e</sup>
90 menit	46,1 % ± 0,39 <sup>c</sup>	53,3 % ± 0,01 <sup>f</sup>
120 menit	47,5 % ± 0,01 <sup>d</sup>	55,0 % ± 0,01 <sup>g</sup>

Keterangan :

- a, b, c, d, e, f, g, merupakan lambang yang menunjukkan ada perbedaan persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis antara waktu paparan 30, 60, 90, 120 menit pada kelompok non propolis dan kelompok propolis.
- Pada waktu paparan 120 menit pada kelompok non propolis dan waktu paparan 30 menit pada kelompok propolis persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis tidak ada perbedaan, hal ini dapat ditunjukkan dengan lambang yang sama yaitu d.





Gambar 5.3 Grafik persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis

Dari data dan grafik diatas menunjukkan bahwa :

- a. Persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis bakteri meningkat sesuai dengan lama waktu paparan makrofag dengan bakteri sampai dengan 120 menit pengamatan.
- b. Pada setiap waktu paparan yang sama, persentase makrofag yang melakukan fagositosis pada kelompok propolis lebih besar dari pada kelompok non propolis. Secara keseluruhan selama 120 menit, persentase makrofag yang melakukan fagositosis pada kelompok propolis juga lebih besar daripada kelompok non propolis.
- c. Ada intersepsi atau interaksi antara pemberian propolis dengan persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis dari kelompok propolis dan kelompok non propolis dalam waktu 30, 60, 90, 120 menit. Pada kelompok propolis persentase jumlah makrofag

yang melakukan fagositosis lebih banyak daripada jumlah makrofag yang melakukan fagositosis pada kelompok non propolis.

- d. Dari uji statistik menggunakan *Multivariate Tests* dan *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5% untuk makrofag kelompok propolis dan kelompok non propolis terdapat perbedaan persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis dalam waktu tertentu yaitu 30, 60, 90, 120 menit menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Data hasil perhitungan statistik, selengkapnya tercantum dalam lampiran.

**b. Rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag.**

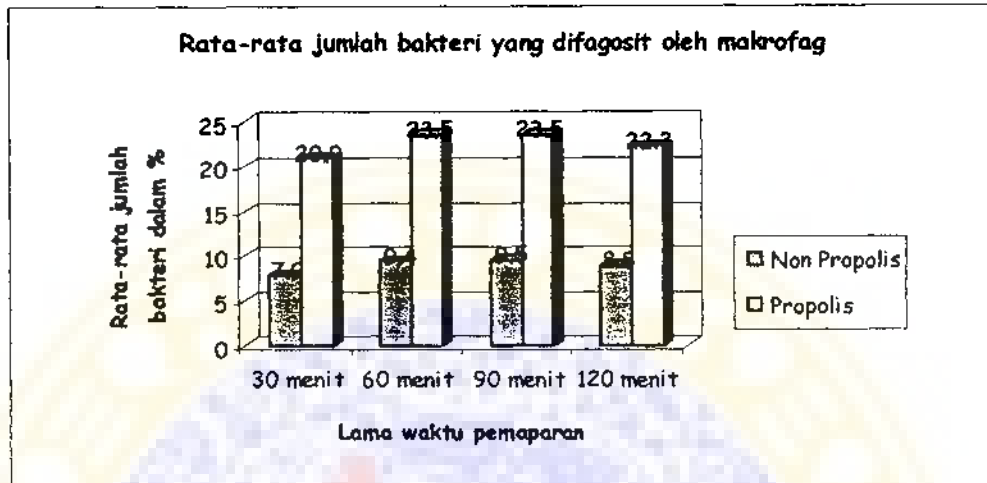
Rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag adalah jumlah seluruh bakteri yang difagosit oleh makrofag dibagi dengan jumlah makrofag yang melakukan fagositosis. Sehingga didapat rata-rata jumlah bakteri yang difagosit per makrofag, seperti dalam tabel dibawah ini.

Tabel 5.2 Rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag

Waktu paparan	Rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag dalam % ± SD	
	Non Propolis	Propolis
30 menit	7,9 ± 0,09 <sup>a</sup>	20,9 ± 0,06 <sup>e</sup>
60 menit	9,4 ± 0,10 <sup>b</sup>	23,5 ± 0,09 <sup>f</sup>
90 menit	9,5 ± 0,17 <sup>c</sup>	23,5 ± 0,00 <sup>f</sup>
120 menit	8,8 ± 0,05 <sup>d</sup>	22,3 ± 0,00 <sup>g</sup>

Keterangan :

- a, b, c, d, e, f, g, merupakan lambang yang menunjukkan ada perbedaan rata-rata jumlah makrofag yang melakukan fagositosis antara waktu paparan 30, 60, 90, 120 menit pada kelompok non propolis dan kelompok propolis.
- Pada waktu paparan 60 dan 90 menit pada kelompok propolis rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag tidak ada perbedaan, hal ini dapat ditunjukkan dengan lambang yang sama yaitu f.



Gambar 5.4 Grafik rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag.

Dari data dan grafik diatas menunjukkan bahwa :

- a. Rata-rata jumlah bakteri yang terfagosit meningkat sesuai dengan lama waktu paparan, kecuali pada menit ke 120 rata-rata jumlah bakteri yang terfagosit mengalami penurunan.
- b. Pada waktu paparan yang sama rata-rata jumlah bakteri yang terfagosit dari kelompok propolis lebih banyak 2,65 kali dibanding dengan kelompok non propolis.
- c. Ada intersepsi atau interaksi antara pemberian propolis dengan jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag pada kelompok propolis dan kelompok non propolis dalam waktu 30, 60, 90 menit, semakin lama waktu terpapar semakin banyak jumlah bakteri yang terfagosit, kecuali pada menit ke 120 rata-rata jumlah bakteri yang terfagosit mengalami penurunan.

d. Dari uji statistik dengan menggunakan *Multivariate Tests* dan *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5% untuk jumlah bakteri yang terfagosit dari makrofag kelompok propolis dan non propolis dalam waktu tertentu yaitu 30, 60, 90, 120 menit menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

**c. Indeks fagositosis.**

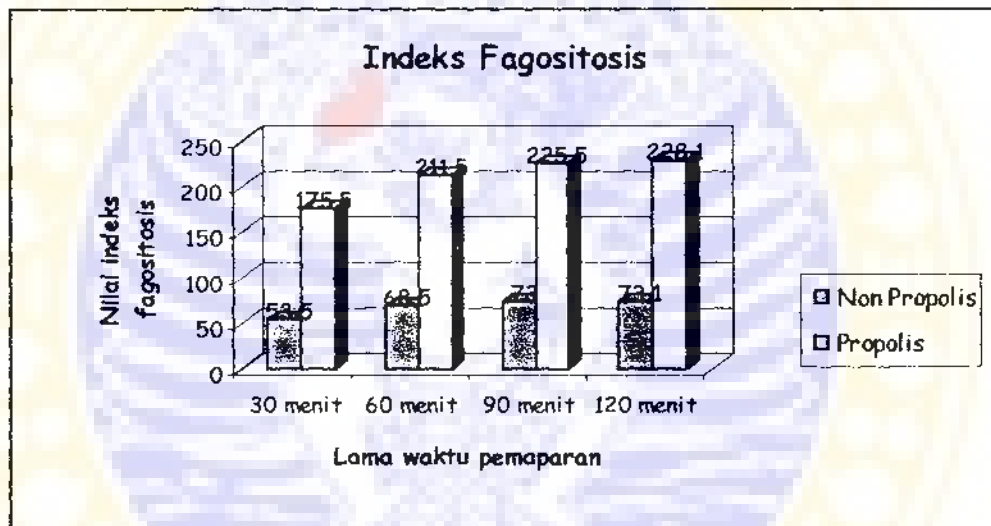
Menurut Bishayi (2000) indeks fagositosis adalah perkalian jumlah makrofag yang mengandung bakteri dengan rata-rata jumlah bakteri per makrofag. Sehingga didapat rata-rata nilai indeks fagositosis, seperti dalam tabel dibawah ini :

Tabel 5.3 Nilai indeks fagositosis dengan standart deviasi untuk kelompok non propolis dan kelompok propolis

Waktu paparan	Rata-rata indeks fagositosis $\pm$ SD	
	Non Propolis	Propolis
30 menit	53,5 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	175,5 $\pm$ 0,58 <sup>e</sup>
60 menit	68,5 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	211,5 $\pm$ 0,58 <sup>f</sup>
90 menit	73,0 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	225,5 $\pm$ 0,29 <sup>g</sup>
120 menit	73,1 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	228,1 $\pm$ 0,50 <sup>h</sup>

Keterangan :

- a, b, c, d, e, f, g, h, merupakan lambang yang menunjukkan ada perbedaan nilai indeks fagositosis jumlah makrofag yang melakukan fagositosis antara waktu paparan 30, 60, 90, 120 menit pada kelompok non propolis dan kelompok propolis.



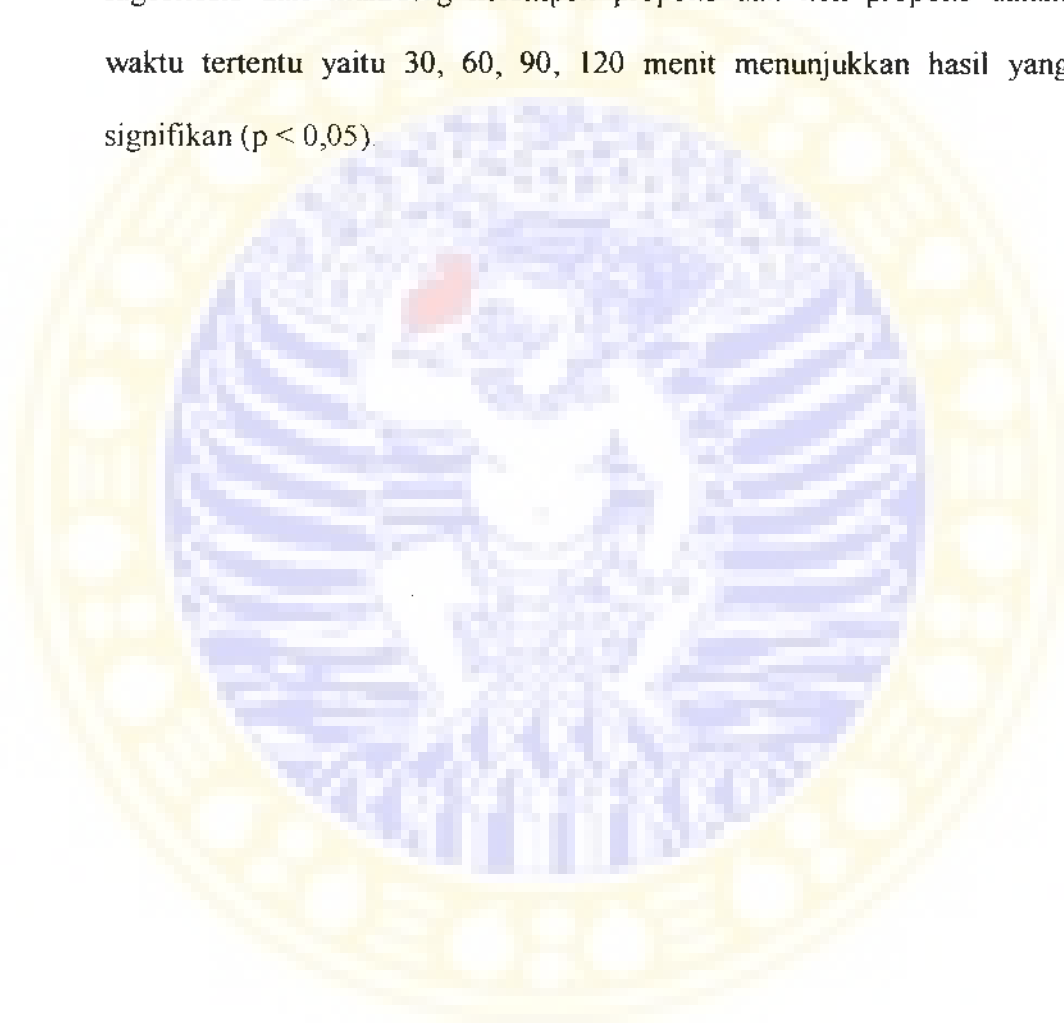
Gambar 5.5 Grafik nilai indeks fagositosis dengan standart deviasi untuk kelompok non propolis dan kelompok propolis

Dari data dan grafik diatas menunjukkan bahwa :

- a. Nilai indeks fagositosis meningkat sesuai dengan lama waktu paparan.
- b. Pada waktu paparan yang sama nilai indeks fagositosis dari kelompok propolis lebih banyak dibanding dengan kelompok non propolis.
- c. Ada intersepsi atau interaksi antara pemberian propolis dengan nilai indeks fagositosis dalam waktu 30, 60, 90, 120 menit, semakin lama waktu

terpapar semakin tinggi nilai indeks fagositosis dalam interval waktu tertentu yang secara keseluruhan selama 120 menit.

- d. Dari uji statistik dengan menggunakan *Mutivariate Tests* dan *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5% untuk nilai indeks fagositosis dari makrofag kelompok propolis dan non propolis dalam waktu tertentu yaitu 30, 60, 90, 120 menit menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ).







## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas variabel bebas (propolis) terhadap variabel tergantung (kemampuan fagositosis intraseluler) dari peritoneal makrofag mencit jantan jenis BALB/c terhadap *Salmonella typhi* dalam interval waktu tertentu. Untuk mencapai tujuan tersebut, maka dilakukan penelitian eksperimental laboratorik sesungguhnya. Dalam penelitian ini terdapat 2 kelompok yaitu kelompok yang mendapat perlakuan (pemberian propolis) dan kelompok yang tidak mendapat perlakuan (non propolis).

Rancangan penelitian yang dipakai adalah *Multivariate Tests* dan *Univariate Analysis of Variance*. Pada *Multivariate Test* untuk mengetahui signifikansi jumlah makrofag yang melakukan fagositosis terhadap bakteri dan jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag dalam interval waktu tertentu dalam kelompok non propolis dan propolis serta indeks fagositosisnya. Sedang pada *Univariate Analysis of Variance* untuk mengetahui signifikansi jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag dalam interval waktu pada kelompok non propolis dan kelompok propolis. Pengukuran terhadap variabel tergantung sebelum perlakuan tidak dilakukan, karena variabel kontrol (jenis kelamin, strain, umur, berat badan mencit donor makrofag, langkah persiapan makrofag) telah diusahakan tidak ada perbedaan, serta pengambilan dan pembagian makrofag kedalam kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan secara acak.

Pada penelitian ini dipilih mencit yang berumur 10 minggu, karena mencit telah mencapai kematangan untuk melakukan respons terhadap antigen (*immune maturation*) pada umur 6 minggu (Harlow *et al.*, 1988). Strain mencit dipilih BALB/c karena strain yang berumur 6 – 12 minggu ini telah terbukti memiliki respons imunitas yang baik (Ralph, 1986). Jenis kelamin mencit dipilih yang jantan karena memiliki lebih banyak makrofag peritoneal dari pada mencit betina (Foster, 1983).

Makrofag mencit diambil dengan lavase peritonium menggunakan bahan PBS meskipun perolehan sel relatif sedikit bila dibandingkan dengan menggunakan bahan iritan lain seperti FBS, thioglikolat, emulsi minyak air. Sebab dalam penelitian ini diharapkan adalah makrofag normal atau istirahat, sedangkan bahan-bahan iritan tersebut dapat mempengaruhi beberapa sifat makrofag. Beberapa perubahan dapat terjadi pada makrofag yang teraktivasi, salah satu diantaranya adalah perubahan fungsi yang meliputi : kecepatan migrasi meningkat, melekat pada kaca lebih cepat, produksi kolagenase, aktivator plasminogen dan prostaglandin meningkat, produksi sitokin dan komplemen meningkat, kemampuan mikrobisidal meningkat, fagositosis dan pinositosis meningkat, memiliki aktivitas anti tumor (Werb,1991).

Untuk menguji ada tidaknya peningkatan kemampuan fagositosis, digunakan metode pengecatan ganda dan mikroskopi fluoresens. Secara teknis metode ini lebih sulit dibandingkan metode seperti pengecatan tunggal dengan giemsa. Namun metode ini dipilih karena dapat membedakan antara bakteri yang benar-benar ditelan makrofag (terletak intraseluler) dengan bakteri yang hanya

melekat atau menempel pada permukaan tapi tidak ditelan (terletak ekstraseluler), sedangkan pengecatan tunggal dengan giemsa tidak dapat benar-benar membedakan antara kedua kelompok tersebut, hal ini sesuai dengan salah satu syarat penilaian aktifitas fagositosis menurut Leijh *et. al.*, (1984).

Adanya bakteri intraseluler dan bakteri ekstraseluler ini disebabkan oleh adanya reseptor C3 pada permukaan sel, yang pada makrofag normal (tidak mengalami aktivasi) hanya dapat mengikat saja tanpa dapat memfagositnya (Greenberg *et. al.*, 1993). Dengan menggunakan lapangan pandang mikroskop cahaya yang bersifat dua dimensi, bakteri yang terikat atau menempel pada permukaan makrofag akan tampak seolah-olah berada didalam sel (sudah difagosit). Akibatnya pembacaan persentase makrofag yang melakukan fagositosis maupun penghitungan jumlah bakteri yang difagositosis akan menjadi bias. Dengan pengecatan ganda dan menggunakan lapangan pandang mikroskop fluoresens, hasil bias dapat dihindari. Bakteri yang akan dihitung menggunakan mikroskop fluoresens pada tahap pertama dilakukan pelabelan dengan fluoresens isothiosianat (FITC) sehingga berfluoresensi hijau. Pada pelabelan ini bakteri sudah mengalami opsonisasi dengan komplemen serum, karena pada proses pelabelan dengan fluoresens isothiosianat (FITC) bakteri sudah ditambahkan serum homolog, sehingga terjadi ikatan antigen antibodi yang berfluoresensi hijau. Kemudian pada tahap kedua, bakteri yang sudah berlabel FITC yang berwarna hijau dipaparkan dengan makrofag agar terjadi proses fagositosis selama 30 sampai 120 menit. Kemudian ditambahkan cat ethidium bromida yang mengubah fluoresensi hijau menjadi merah-oranye pada bakteri yang terpapar

oleh fluorokrom tersebut. Bakteri yang sudah difagositosis dan terletak intraseluler tetap berwarna hijau, karena bakteri tersebut terletak didalam makrofag sehingga terlindungi dari paparan dengan cat ethidium bromida. Sedangkan bakteri yang masih terletak diluar makrofag akan berubah warna fluoresensinya menjadi merah-oranye karena terpapar oleh ethidium bromida. Dengan melihat perbedaan warna tersebut yaitu warna hijau dan merah-oranye pada mikroskop fluoresens maka dapat dibedakan antara bakteri yang sudah difagosit oleh makrofag (intraseluler) dan bakteri yang berada diluar atau permukaan makrofag (ekstraseluler).

Menurut Dreved *et.al.*, (1991), Ethidium bromida memang dapat mengadakan penetrasi kedalam sel makrofag, namun hal ini baru terjadi setelah 20 – 30 menit pemberian ethidium brobida, sehingga pembacaan harus dilakukan sebelum 20 menit sejak penetasan. Selain itu fluorokrom ini akan lebih terkonsentrasi kedalam inti dan hanya sedikit yang terdapat didalam sitoplasma, sehingga tidak sampai mengubah warna fluoresensi bakteri yang terdapat dalam sitoplasma sel dari hijau menjadi merah-oranye.

*Salmonella typhi* dipilih sebagai bakteri uji pada penelitian ini, karena bakteri tersebut adalah patogen intrasel pada manusia yang mampu menghindar atau bertahan dari proses pembunuhan intraseluler oleh makrofag normal atau istirahat. Hal ini disebabkan *Salmonella* memiliki dua daerah pertahanan yaitu SPI-1 dan SPI-2 yang mampu melindungi diri dari proses penggabungan antara fagosom dan lisosom (Karlsson, 2004). *Salmonella typhi* dapat dibunuh secara efektif oleh makrofag teraktivasi, sehingga bakteri ini dapat dipakai sebagai uji

peningkatan kemampuan fagositosis intraseluler yang merupakan salah satu ciri makrofag teraktivasi (Roitt *et al.*, 2001). Ada tidaknya peningkatan fagositosis terhadap *Salmonella typhi* sebagai salah satu bakteri intraseluler dapat diketahui dari persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis, rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag, nilai indeks fagositosis dan diidentifikasi dengan menggunakan metode *double staining fluorescence* (Drevet & Campbel, 1991).

Pada uji fagositosis ini digunakan bakteri yang sudah dinaktif dengan pemanasan selama 60 menit pada suhu  $56^{\circ}\text{C}$  untuk meniadakan replikasi bakteri selama pengamatan yang akan mempengaruhi hasil pengamatan terutama selang waktu fagositosis yang lebih lama sampai 120 menit. Selain itu pemanasan selama 60 menit pada suhu  $56^{\circ}\text{C}$  telah dibuktikan oleh Drevet dan Campbell (1991) tidak mengubah struktur permukaan semua agen infeksi (dalam penelitian ini menggunakan bakteri *Salmonella typhi*) yang dapat mempengaruhi fagositosis oleh makrofag.

Rasio makrofag dengan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 : 10, karena bila rasio terlalu kecil misalnya 1 : 1, atau jumlah bakteri terlalu sedikit maka rangsangan antigen atau bakteri terhadap makrofag akan kurang sehingga makrofag ada yang tidak terpapar dengan antigen dan aktivitas fagositosis tidak optimal. Sedang bila rasio terlalu besar misalnya 1 : 100, akan terjadi penelanan bakteri oleh makrofag yang terlalu banyak, sehingga menyebabkan otolisis atau pecahnya makrofag.

Dari uji fagositosis secara *in vitro* pada kelompok non propolis bila dibandingkan dengan kelompok propolis terdapat peningkatan jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag sebesar 2,65 kali. Peningkatan aktivitas fagositosis dapat terjadi karena peningkatan jumlah reseptor komplemen yaitu reseptor C3. Makrofag mempunyai reseptor C3 yang aktif berbentuk C3b, sehingga dengan adanya komplemen, kompleks mikroorganisme dengan antibodi pengikat komplemen menimbulkan opsonisasi. Opsonisasi melalui pengikatan C3 dapat dihalangi oleh inaktivator C3b yang terdapat didalam serum. Inaktivator C3b ini melepaskan C3b dari mikroorganisme sebelum terjadi opsonisasi. Kompleks mikroorganisme antibodi yang terikat dengan C3 yang aktif dapat juga melekat pada eritrosit. Karena eritrosit terdapat dalam jumlah besar, maka kesempatan opsonisasi seluruh kompleks (mikroorganisme, antibodi, komplemen, dan eritrosit) adalah lebih besar sebelum inaktivasi C3b terjadi, sehingga mampu mengikat sekaligus menelan bakteri, dan peningkatan aktivitas reseptor fagositosis non imun yaitu reseptor mannose.

Kenaikan indeks fagositosis pada kelompok propolis dalam 30 menit pertama bila dibandingkan dengan menit berikutnya yaitu 60 sampai 120 menit kemudian tidak mencerminkan kenaikan yang stabil, tetapi cenderung mengalami penurunan. Jika pada kelompok non propolis nilai rata-rata indeks fagositosis 53,5 sedangkan pada kelompok propolis nilai rata-rata indeks fagositosis 175,5, maka untuk 30 menit berikutnya seharusnya lebih tinggi dari nilai rata-rata indeks fagositosis yang didapat yaitu 68,5 untuk nilai rata-rata indeks fagositosis pada kelompok non propolis dan 211,5 untuk nilai rata-rata indeks fagositosis.

Kenaikan yang tidak stabil ini disebabkan karena sebagian bakteri sudah mulai didegradasi sehingga tidak tampak lagi pada pemeriksaan mikroskopi dan mempengaruhi pembacaan hasil pengamatan.





BAB 7

PENUTUP



## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

1. Pemberian propolis dapat meningkatkan kemampuan fagositosis intraseluler *Salmonella typhi* dari makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c secara *in vitro*.
2. Makin lama waktu paparan antara makrofag peritoneal mencit jantan jenis BALB/c dengan bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro* makin meningkatkan jumlah bakteri yang difagosit.
3. Ada intersepsi atau interaksi antara pemberian propolis dengan jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag, jumlah makrofag yang melakukan fagositosis dan nilai indeks fagositosis dalam waktu 30, 60, 90, 120 menit.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan studi *in vitro* apakah propolis juga memiliki efek imunomodulator terhadap makrofag manusia.
2. Perlu dilakukan studi *in vivo* untuk mengetahui apakah propolis memiliki efek imunomodulator pada pemberian peroral.
3. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek pemberian propolis terhadap kemampuan fagositosis intraseluler makrofag terhadap bakteri lain.

4. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek propolis terhadap komponen sistem imun lain, misalnya limfosit, baik pada sistem imun yang normal maupun yang mengalami gangguan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000, *Cellular and mollecular immunology*, 4<sup>th</sup> edition, Philadelphia: W.B. Saunders.
- Anonimus, 2000, *Propolis*, PDR health publication, Pharmacol. Res. Commun. 20, 323-8.
- Baratawidjaja KG, 2001, *Imunologi Dasar*, Edisi keempat, Jakarta : Balai Penerbit FKUI.
- Betjes MGH, Havenith CEG, Loosdrecht AA, Beelen RHJ, 1994, *Methods for studying immuno-effector function and antigen presenting activity of human macrophages*, J.Immun Meth 174.
- Bishayi B, 2000, *Sodium arsenit induced alteration in funcional activity of murine peritoneum macrophage*. Indian journal of pharmacology 32: 192-7.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA, 2001, *Medical Microbiology*. Diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Dimov V, Ivanovska N, Manolova N, Baknova V, Nikolov N, Popov S, 1991, *Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function*. Apidologie.
- Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S, 1992, *Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infection and adjuvant effect of water-soluble derivative*. J.Immunology.
- Dissel Jt, Sikkelbroeck JJM, Barselaar MT, Sluiter W, Leijh PCJ, Furth R, 1987, *Divergent shanges in antimicrobial activity after immunologic activation of mouse peritoneal macrophages*. J.immunology.
- Drevets DA, Campbell PA, 1991, *Macrophage phagocytosis: use of fluroescence microscopy to distinguish beetween extra and intracellular bactria*. J.Imun.Meth.
- Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS, 2002, *Immunochemical Methods Used For Organism Detection*. In Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 11<sup>th</sup> ed, London, Mosby, Inc.

- Greenberg S, Silverstein SC, 1993, *Phagocytosis*. In (Paul WE, ed) *Fundamental immunology*, 3<sup>rd</sup> ed, New York: Raven Press.
- Ivanovska N, Stefanova Z, Valeva V, Neychev H, 1993, *Immunomodulatory action of propolis*: VII. A comparative study on cinnamid and caffeic acid lysine derivatives. *Biol. Immun*, 46, 115-7.
- Jaffe HS, Sherwin SA, 1991, *Immunomodulators*. In (Stites DP, Terr AI, eds) *Basic and clinical immunology*, 7th ed, USA: Appleton and Lange, pp 780-785.
- Karlsson C, 2004, *Salmonella's mechanism for surviving macrophage phagocytosis*, Departement of Molecular Biology Bacterial Virulence and Physiology 10p Seminar abstract.
- Karnisah, Lucky HM, Suharto, Mardiasuti HW, 1994, *Batang gram negatif (Enterbacteriaceae) dalam buku ajar Mikrobiologi Kedokteran*, edisi revisi, Staf pengajar FKUI, Jakarta, Binarupa Aksara, hal 168-172.
- Katz P, 1993, *Imunomodulasi : Imunopotensiasi, toleransi, dan imunosupresi*, Dalam (Bellanti JA, ed) *Imunologi III* diterjemahkan oleh Wahab SA, Yogyakarta, Gajah Mada University Press, hal 203-211.
- Koga T, Kikuchi M, 1993, *Isolation and characterization of a novel immunomodulating fraction from soybean*, *Biosci, Biotech, Biochem*, 57 : 367-371.
- Leijh PC, Furth R, Zwet TL, 1986, *In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes*. In (Weir, et.al., eds) *Handbook of experimental immunology in 4 volumes*. Vol 2: Cellular immunology. Oxford : Blackwell scientific publications, pp 46.1.18.
- Miller LE, Ludke HR, Peacock JE, Tomar RH, 1991, *Manual of laboratory immunology*, 2nd ed, Philadelphia : Lea and Febiger, pp. 159-189.
- Morahan PS, Coleman PH, Morse SS, Volkman A, 1982, *Resistance to infection in mice with defects in the activities of MN phagocytes and natural killer cell*, Effects of immunomodulators in bbeige mice and 89Sr-Treated mice. *Infection and immunity* 37 : 1079-1085.
- Mundo MA, Padilla-Zakour IP, Worobo RW, 2002, *Antimicrobial activity of honey against food pathogens and food spoilage microorganisms*, Departement of food science and technology, Cornell University, NYSAES, W North St, Genewa, NY14456.

- Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvisa *et al.*, 2002, *Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation*, Journal of venomous animals and toxins v.6 n.2. Botucatu.
- Parslow TG *et al.*, 2001, *Medical Immunology*, 10ed . USA. Lange Medical Book/ McGraw-Hill Medical Publising Division.
- Pieters Jean, 2001, *Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria*. Basel Institute for Immunology. Elsevier Science Ltd.
- Plasman N, Vray B, 1994, *Qualification of bacterial phagocytosis by flow cytometry and spectrofluorometry*. J. Immun. Methd, 174: 195 - 202
- Puri A, Saxena RP, Sumati, Guru PY, Kulsreshta DK, Saxena KC, Dhawan BN, 1992, *Immunostimulant activity of picroliv, the iridoid glycoside fraction of Picrorhiza kurroa, and its protective action against Leishmania donovani infection in hamsters*. Planta Med, 58 : 528-532.
- Rocklin RE, 1982, Mediators of cellular immunity. In (Stites, *et al.*, eds) *Basic and clinical immunology*, 4<sup>th</sup> ed, Los Altos : Lange Medical Publication, pp 97-102.
- Roitt I, 2002, *Essential Immunologi* 8<sup>th</sup> Ed, terjemahan Alida Harahap *et al.*, Jakarta, Widya Medika.
- Roitt I, J.Brostoff and Demale, 2001, *Immunology*. 6<sup>th</sup> Ed. Harcourt Publisher Ltd, London.
- Scheller S, Gadza G, Pietz G, Gabrys J, Szumlas J, Eckert L, Shani J, 1998, *The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cell*. Pharmacol. Res. Commun. 20, 323-8.
- Seaman W, 1991, Approach to immune response modulation. In (Stites DP, Terr AI, eds) *Basic and Clinical Immunology*. 7<sup>th</sup> ed, USA, Appleton and Lange, pp 717-722.
- Sforcin JM, Funari SRC, Novelli ELB, 1996, *Serum biochemical determination of propolis-treated rats*. J. Venom. Anim. Toxin, 1, 31-7.
- Soemarno, 2000, *Isolasi dan identifikasi bakteri klinik*. Yogyakarta, Akademi Analis Kesehatan Dep Kes RI.
- Stuart AE, Habeshaw JA, Davidson E, 1978, *Phagocytes in vitro*. In (Weir DM, *et al.*, eds), *Handbook of experimental immunology*, 3<sup>rd</sup> ed, Oxford : Blackwell scientific publications, pp 31.1-31.4.

- Subowo, 1993, *Fagositosis*, Dalam : *Imunobiologi*, Bandung, Angkasa, 151-165.
- Sudjana, 1996, *Metoda Statistika*, edisi 6, Bandung, Tarsito.
- Sujudi dkk, 1994, *Proses kekebalan*, Dalam buku ajar *Mikrobiologi Kedokteran*, edisi revisi, Staf pengajar FKUI, Jakarta, Binarupa Aksara, hal 81-83.
- Sutjihno, 1986, *Rancangan Percobaan*, Bogor.
- Werb Z, 1982, *Phagocytic cells : Chemotaxis and effector functions of macrophage and granulocytes*. In (Stites *et al*, ed) *Basic and clinical immunology*, 2<sup>nd</sup> ed, Los Altos : Lange Medical Publication, pp 109-117.
- Wing EJ, Remington JS, 1978, *Deleyed type hypersensitivity and macrophage funtion*. In (Fudenberg *et al*, eds) *Basic and clinical immunology*, 2<sup>nd</sup> ed, Los Altos : Lange Medical Publication, pp 100-109.

## Lampiran 1

**Tabel persentase jumlah makrofag yang melakukan fagositosis, rata-rata jumlah bakteri yang difagosit oleh makrofag dan nilai indeks fagositosis pada kelompok propolis dan non propolis dalam waktu 30, 60, 90, 120 menit.**

	Waktu	propolis	makrofag	bakteri	indekfag
1.	1	1	42.62	2.08	54.0
2.	1	1	43.33	2.08	54.0
3.	1	1	42.62	2.04	53.0
4.	1	1	43.33	2.04	53.0
5.	1	2	47.5	6.03	175.0
6.	1	2	47.5	6.07	176.0
7.	1	2	47.5	6.03	175.0
8.	1	2	47.5	6.07	176.0
9.	2	1	44.26	2.52	68.0
10.	2	1	44.26	2.56	69.0
11.	2	1	44.26	2.52	68.0
12.	2	1	45	2.56	69.0
13.	2	2	50	7.03	211.0
14.	2	2	50	7.07	212.0
15.	2	2	50	7.03	211.0
16.	2	2	50	7.07	212.0
17.	3	1	45.9	2.6	72.8
18.	3	1	45.9	2.6	72.8
19.	3	1	46.67	2.61	73.1
20.	3	1	45.9	2.61	73.1
21.	3	2	53.3	7.27	225.4
22.	3	2	53.3	7.28	225.7
23.	3	2	53.3	7.28	225.7
24.	3	2	53.3	7.26	225.1
25.	4	1	47.54	2.52	73.1
26.	4	1	47.54	2.56	73.1
27.	4	1	47.5	2.56	73.1
28.	4	1	47.5	2.56	73.1
29.	4	2	55	7.12	227.8
30.	4	2	55	7.15	228.8
31.	4	2	55	7.12	227.8
32.	4	2	55	7.12	227.8

Keterangan :

Waktu :

1 = 30 menit    3 = 90 menit  
2 = 60 menit    4 = 120 menit

Propolis :

1 = kelompok non propolis  
2 = kelompok propolis

## General Linear Model

### Warnings

Post hoc tests are not performed for Pemberian propolis because there are fewer than three groups.

### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Lama waktu terpapar	1	30 menit	8
	2	60 menit	8
	3	90 menit	8
	4	120 menit	8
Pemberian propolis	1	Non propolis	16
	2	Propolis	16

### Multivariate Tests<sup>c</sup>

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	8355840 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	8355840 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
	Hotelling's Trace	1139433	8355840 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
	Roy's Largest Root	1139433	8355840 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
WAKTU	Pillai's Trace	2.445	35.208	9.000	72.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	1782.814	9.000	53.693	.000
	Hotelling's Trace	74647.057	171411.8	9.000	62.000	.000
	Roy's Largest Root	74641.119	597129.0 <sup>b</sup>	3.000	24.000	.000
PROPOLIS	Pillai's Trace	1.000	3314039 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	3314039 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
	Hotelling's Trace	451914.5	3314039 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
	Roy's Largest Root	451914.5	3314039 <sup>a</sup>	3.000	22.000	.000
WAKTU * PROPOLIS	Pillai's Trace	1.771	11.525	9.000	72.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	498.924	9.000	53.693	.000
	Hotelling's Trace	12838.811	29481.715	9.000	62.000	.000
	Roy's Largest Root	12836.110	102688.9 <sup>b</sup>	3.000	24.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+WAKTU+PROPOLIS+WAKTU \* PROPOLIS



## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Jumlah makrofag yang memfagosit	488.379 <sup>a</sup>	7	69.768	1230.235	.000
	Jumlah bakteri yang terfagosit	208.727 <sup>b</sup>	7	29.818	66042.330	.000
	Indeks fagositosis	685894.425 <sup>b</sup>	7	97984.918	630571.6	.000
Intercept	Jumlah makrofag yang memfagosit	74819.692	1	74819.692	1319305	.000
	Jumlah bakteri yang terfagosit	869.362	1	869.362	1925496	.000
	Indeks fagositosis	2207862.178	1	2207862.178	1.4E+07	.000
WAKTU	Jumlah makrofag yang memfagosit	169.915	3	56.638	998.709	.000
	Jumlah bakteri yang terfagosit	25.110	3	8.370	18538.096	.000
	Indeks fagositosis	99950.078	3	33316.693	214406.1	.000
PROPOLIS	Jumlah makrofag yang memfagosit	306.715	1	306.715	5408.334	.000
	Jumlah bakteri yang terfagosit	181.223	1	181.223	401379.2	.000
	Indeks fagositosis	569044.455	1	569044.455	3662026	.000
WAKTU * PROPOLIS	Jumlah makrofag yang memfagosit	11.750	3	3.917	69.061	.000
	Jumlah bakteri yang terfagosit	2.394	3	.798	1767.598	.000
	Indeks fagositosis	16899.891	3	5633.297	36252.491	.000
Error	Jumlah makrofag yang memfagosit	1.361	24	5.671E-02		
	Jumlah bakteri yang terfagosit	1.084E-02	24	4.515E-04		
	Indeks fagositosis	3.729	24	.155		
Total	Jumlah makrofag yang memfagosit	75309.431	32			
	Jumlah bakteri yang terfagosit	1078.099	32			
	Indeks fagositosis	2893760.332	32			
Corrected Total	Jumlah makrofag yang memfagosit	489.740	31			
	Jumlah bakteri yang terfagosit	208.738	31			
	Indeks fagositosis	685898.154	31			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

b. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

## Post Hoc Tests Lama waktu terpapar

### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Lama waktu terpapar	(J) Lama waktu terpapar	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Jumlah makrofag yang memfagosit	30 menit	60 menit	-1.9850*	.1191	.000	-2.2308	-1.7392
		90 menit	-4.4588*	.1191	.000	-4.7045	-4.2130
		120 menit	-6.0225*	.1191	.000	-6.2683	-5.7767
	60 menit	30 menit	1.9850*	.1191	.000	1.7392	2.2308
		90 menit	-2.4738*	.1191	.000	-2.7195	-2.2280
		120 menit	-4.0375*	.1191	.000	-4.2833	-3.7917
	90 menit	30 menit	4.4588*	.1191	.000	4.2130	4.7045
		60 menit	2.4738*	.1191	.000	2.2280	2.7195
		120 menit	-1.5637*	.1191	.000	-1.8095	-1.3180
	120 menit	30 menit	6.0225*	.1191	.000	5.7767	6.2683
		60 menit	4.0375*	.1191	.000	3.7917	4.2833
		90 menit	1.5637*	.1191	.000	1.3180	1.8095
Jumlah bakteri yang terfagosit	30 menit	60 menit	-.7400*	1.062E-02	.000	-.7619	-.7181
		90 menit	-1.5052*	1.062E-02	.000	-1.5272	-1.4833
		120 menit	-2.3837*	1.062E-02	.000	-2.4057	-2.3618
	60 menit	30 menit	.7400*	1.062E-02	.000	.7181	.7619
		90 menit	-.7652*	1.062E-02	.000	-.7872	-.7433
		120 menit	-1.6437*	1.062E-02	.000	-1.6657	-1.6218
	90 menit	30 menit	1.5052*	1.062E-02	.000	1.4833	1.5272
		60 menit	.7652*	1.062E-02	.000	.7433	.7872
		120 menit	-.8785*	1.062E-02	.000	-.9004	-.8566
	120 menit	30 menit	2.3837*	1.062E-02	.000	2.3618	2.4057
		60 menit	1.6437*	1.062E-02	.000	1.6218	1.6657
		90 menit	.8785*	1.062E-02	.000	.8566	.9004
Indeks fagositosis	30 menit	60 menit	-40.5625*	.1971	.000	-40.9693	-40.1557
		90 menit	-94.2500*	.1971	.000	-94.6568	-93.8432
		120 menit	-148.3687*	.1971	.000	-148.7755	-147.9620
	60 menit	30 menit	40.5625*	.1971	.000	40.1557	40.9693
		90 menit	-53.6875*	.1971	.000	-54.0943	-53.2807
		120 menit	-107.8062*	.1971	.000	-108.2130	-107.3995
	90 menit	30 menit	94.2500*	.1971	.000	93.8432	94.6568
		60 menit	53.6875*	.1971	.000	53.2807	54.0943
		120 menit	-54.1188*	.1971	.000	-54.5255	-53.7120
	120 menit	30 menit	148.3687*	.1971	.000	147.9620	148.7755
		60 menit	107.8062*	.1971	.000	107.3995	108.2130
		90 menit	54.1188*	.1971	.000	53.7120	54.5255

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.