

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL JINTEN HITAM
(*Nigella sativa* L.), TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS
MAKROFAG MENCIT *Swiss* YANG
DIINFEKSI *P. berghei*, SECARA *IN VITRO***

Titiek Hidayati¹, Akrom²

INTISARI

Efek imunostimulansia ekstrak etanol Nigella sativa (EENS) pada mencit Swiss selama diinfeksi P. berghei belum banyak dikaji. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh pemberian ekstrak etanol jinten hitam terhadap persentase fagositosis makrofag mencit galur Swiss jantan yang diinfeksi P. berghei secara in vitro.

Digunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium pada 15 mencit Swiss jantan yang diinfeksi dengan P. berghei. Pada hari ke-3 setelah inokulasi parasit malaria, ke 15 ekor mencit tersebut dibunuh untuk diambil makrofagnya, makrofag peritoneum diambil untuk diperiksa aktivitas fagositosis serta diambil apusan darah tepinya untuk memonitor parasitemia. Uji fagositosis dilakukan in vitro menggunakan latex beads diameter 3 mikroliter. Setelah dikultur sehari, kemudian ditambahkan EENS sesuai dosis perlakuan yaitu 0,06125 µg, 0,0125 µg, 0,3125 µg, 1,8125 µg, 0,0025 µg dan 3 µg /sumuran dan suspensi latek 200 µL/sumuran, sedangkan kelompok kontrol negatif menggunakan larutan RPMI. Setelah diinkubasi selama 10 menit kemudian dihitung aktivitas fagositosis makrofag dengan cara menghitung rerata persentase fagositosis oleh 100 makrofag.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase fagositosis makrofag meningkat pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan kontrol negative. Kelompok dengan pemberian 0,0125 µg /sumuran EENS memiliki rerata persentase fagositosis makrofag yang paling tinggi, yaitu 62 %. Disimpulkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol Nigella sativa 0,0125 µg/sumuran memiliki efek peningkatan aktivitas fagositosis makrofag yang lebih baik dibandingkan dengan dosis lainnya.

Kata kunci: ekstrak etanol *Nigella sativa*, ktivitas fagositosis makrofag, malaria, imunitas

1 Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

2 Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

PENDAHULUAN

Dalam suatu hadist yang diriwayatkan oleh Abu Hurairah dari Abu Salamah bahwasannya Rosululloh Muhammad saw pernah menyatakan bahwa "Gunakanlah habba sauda (*Nigella sativa*) karena di dalamnya terdapat obat dari segala macam penyakit kecuali kematian" (HR. Bukhori Muslim). Jinten hitam atau habba sauda (*Nigella sativa*) dikenal dalam literatur islam sebagai obat untuk segala penyakit. Jinten hitam mengandung bahan aktif minyak asiri, trace elemen, vitamin, mineral, nigellin dan timokinon yang memiliki efek sebagai antiinfeksi, antikanker, antialergi maupun sebagai imunomodulator (Ali *et al*, 2003).

Makrofag berperan penting pada mekanisme kerja sistem imun seluler (Warren, 1993). Makrofag sebagai efektor pada sistem imun seluler, berperan untuk memusnahkan *Plasmodium*, terutama pada tahap eritrositer, baik melalui mekanisme fagositosis langsung maupun melalui mekanisme tak langsung dengan melepaskan *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) dan sitokin (Wijayanti, 2000). Stimulasi oleh adanya antigen yang masuk ke dalam tubuh hospes akan membangkitkan respon imun dari makrofag, dimana makrofag yang semula dalam keadaan istirahat kemudian menjadi dalam keadaan aktif atau siaga, dimana hal ini ditandai dengan perubahan bentuk, perubahan biokimiawi dan perubahan fungsi dari makrofag (Baratawidjaya, 2000; Harijanto, 2000).

Aktifitas makrofag dapat ditingkatkan dengan pemberian zat – zat yang bersifat imunostimulansia (Fitri, 1996; Supargiyono, 1993; Wijayanti, 1997). Vaksinasi pada mencit terinfeksi malaria dengan vaksin *P. Berghei* stadium eritrositik terbukti meningkatkan kadar *interferon* γ' , kemampuan fagositosis makrofag terhadap *Plasmodium* secara *in vivo*, maupun produksi ROI (Supargiono, 1993; Wijayanti, 1997). Demikian juga pemberian immunoglobulin dari penderita malaria *falsiparum* terbukti juga telah meningkatkan daya fagositosis makrofag (Harjanto, 2000). Secara *in vivo*, pemberian ekstrak teh hijau, yang

banyak mengandung polifenol, pada tikus terinfeksi *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) terbukti meningkatkan fagositosis makrofag terhadap *S. typhimurium* disamping juga meningkatkan kadar *interferon* γ yang dihasilkan oleh sel T_{HI} (Ratnaningsih, 2001). Pemberian zat-zat imunostimulansia dari bahan bioaktif kandungan ekstrak etanol jinten hitam diduga dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

Penelitian ini dirancang untuk mengkaji pengaruh pemberian ekstrak etanol jinten hitam terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit *Swiss* yang diinfeksi oleh *P. berghei*. Berdasarkan latar belakang yang dijelaskan diatas maka permasalahan penelitian yang diajukan pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol jinten hitam terhadap aktifitas persentase fagositosis makrofag mencit yang diinfeksi *P.berghei* secara *in vitro* ?. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol jinten hitam terhadap persentase fagositosis makrofag mencit galur *Swiss* jantan yang diinfeksi *P. berghei*, secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Inkubator CO², sentrifuse, microplate reader, inverted microscope, kamera, minor set, spuit injeksi 10 cc, laminar air flow hood, timbangan, alat gelas, hemositometer; pipet, objek gelas.

Bahan

Bahan utama yang dipergunakan meliputi: ekstrak etanol jinten hitam yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Farmasi Fak. Farmasi UGM Yogyakarta, vasin *P. berghei* stadium eritrosit diperoleh dari Lab. Parasitologi FK UGM, parasit *P. berghei* galur anka (PbA) yaitu salah satu malaria model pada mencit yang diperoleh dari laboratorium parasitologi FK UGM,

medium tumbuh untuk kultur sel makrofag yaitu RPMI - 1640 (GIBCO) yang mengandung : 10 % Fetal Bovine Serum (FBS); 1 mM sodium Bicarbonat ; 2 mM L-Glutamin; 100 u Penicillin dan 0,5 mg streptomycin, Patikel lateks dan pewarna giemsa.

Hewan coba

Hewan coba yang dipakai dalam penelitian ini adalah 15 ekor mencit Swiss jantan yang berumur 6-8 minggu dengan berat berkisar 20 – 30 gram yang diperoleh dari laboratorium parasitologi FK UGM. Mencit dipelihara dalam sangkar besi berukuran 50 x 30 x 20 cm, tiap sangkar berisi 7 - 8 ekor mencit, diberi makan pellet 529 dan diberi minum secukupnya (Wijayanti, 1997).

Jalannya Penelitian

a. Pembiakan parasit. *Plasmodium berghei galur ANKA* dibiakkan dalam mencit Swiss di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran FK UGM Jogjakarta

b. Persiapan hewan coba

Sebanyak 15 mencit Swiss diinfeksi dengan *P. berghei*. Infeksi pada hewan coba dilakukan dengan cara menyuntikkan intraperitoneal 0,2 ml inokulum yang mengandung 1×10^8 parasit stadium eritrositik tiap mencit.. Pada hari ke- 3 setelah inokulasi parasit malaria, ke 15 ekor mencit tersebut dibunuh untuk diambil makrofagnya, makrofag peritoneum diambil untuk diperiksa aktivitas fagositosis serta diambil apusan darah tepinya untuk memonitor parasitemia (Wijayanti, 1999).

c. Isolasi dan kultur makrofag

Dari kelima kelompok mencit pada hari ke-4 setelah diinfeksi semua mencit dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform untuk diambil makrofagnya. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70 %, kemudian disuntikkan 10 ml medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu selama 3 menit sambil digoyang - goyang secara perlahan.

Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara menekan rongga dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat disentrifuse pada 1200 rpm, 4° C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet diresuspensi dengan RPMI yang mengandung FCS 10 %. Jumlah sel dihitung dengan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan larutan *trypan blue*, kemudian ditambahkan dengan medium komplet sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ / ml. Suspensi sel ditumbuhkan dalam mikrokultur 24 sumuran yang telah diberi coverslips bulat. Setiap sumuran diisi 200 mikroliter (5×10^5 sel). Sel diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5 %, 37 C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium komplet sebanyak 1 ml tiap sumuran dan diinkubasikan 2 jam. Sel dicuci 2x dengan RPMI 1 ml tiap sumuran dan inkubasi dalam medium komplet dilanjutkan sampai 24 jam.

d. Uji fagositosis

Uji fagositosis dilakukan in vitro menggunakan latek beads diameter 3 mikroliter (Wijayanti, 1997). Partikel latek diresuspensikan dalam PBS sehingga didapatkan konsentrasi $2,5 \times 10^7$ / ml. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2 x dengan medium RPMI, kemudian ditambahkan minyak jinten sesuai dosis perlakuan yaitu 5, 10 dan 15 µL/sumuran dan suspensi latek 200 µL/sumuran, diinkubasikan dalam incubator CO₂ 5 %, 37 C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3 x, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan methanol absolut selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan Giemsa 20 %. Persentase sel makrofag yang memfagositosis partikel latex dan banyaknya partikel latek yang difagositosis dihitung dari sekitar 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

e. Uji perbedaan rerata antar kelompok menggunakan uji anova satu jalan. ada penelitian ini analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi makrofag mencit *Swiss* jantan yang terinfeksi *P.berghei* dilakukan pada hari ketiga dimana pada seluruh hewan coba telah mengalami parasitemia. Hal itu sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa parasitemia pada mencit *Swiss* yang diinfeksi oleh *P.berghei* sebanyak $1 \times 10^8/0,2$ ml yang diberikan secara intraperitoneal mulai terlihat adanya parasitemia pada hari ke 2 atau 3 setelah infeksi. Infeksi *P. berghei* pada mencit *Swiss* dengan dosis 1×10^8 akan memberikan parasitemia sejak hari ke-dua setelah infeksi dan akan bertahan sampai hari ke 9 sampai hari ke 12 pasca infeksi untuk akhirnya mencit bersangkutan mati (Wijayanti, 1997).

1. Fagositosis makrofag

latek. Di hitung prosentase makrofag yang memfagositosis latek dan jumlah keseluruhan latek yang difagositosis oleh 100 makrofag. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop menggunakan perbesaran 400 X.

Besarnya prosentase fagositosis makrofag pada berbagai kelompok percobaan nampak pada table 1. Jumlah latek intramakrofag pada 100 makrofag yang melakukan fagositosis tampak pada table 2.

Secara umum tampak bahwa prosentase fagositosis makrofag meningkat pada semua kelompok perlakuan semua dosis dibandingkan kontrol negative. Hal demikian juga tampak pada uji latek untuk melihat aktivitas makrofag. Secara umum terlihat bahwa jumlah latek yang difagositosis makrofag meningkat dibandingkan

Tabel I. Prosentase fagositosis makrofag mencit *Swiss* jantan yang diinfeksi *P.berghei* setelah diinkubasi dengan ekstrak etanol jinten hitam selama 10 menit dan nilai perbedaan rerata prosentase fagositosis makrofag antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (RPMI).

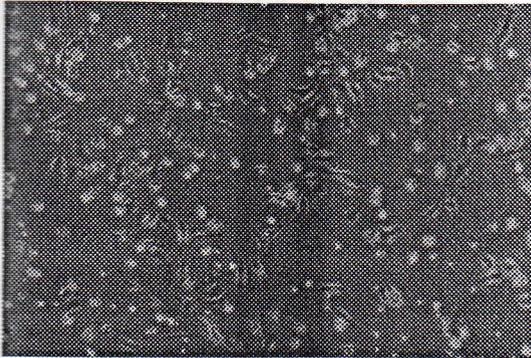
Kelompok Dosis (μ g)	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum	Sig (p)
Kel.dosis 0,0025	49,5	3,54	2,5	47	52	0,02
Kel dosis 0,0125	62	0	0	62	62	0
Kel dosis 0,06125	58,5	7,78	5,5	53	64	0
Kel dosis 0,36125	59	1,41	1	58	60	0
Kel dosis 1,8125	49	1,41	1	48	50	0,02
Kel dosis 3	49	8,49	6	43	55	0,02
Kel Kontrol negatif RPMI	33	7,07	5	28	38	1

Makrofag hasil isolasi kemudian dikultur selama 24 jam sebelum diberi perlakuan. Gambaran makrofag hasil kultur sebelum diberi perlakuan adalah tampak pada gambar 1. Hasil fagositosis kultur makrofag setelah diinkubasi dengan ekstrak etanol jinten hitam selama 10 menit adalah tampak pada table 1.

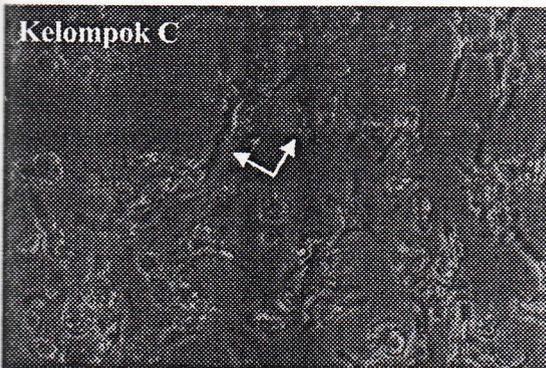
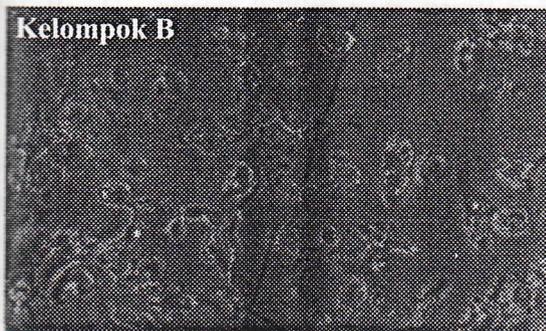
Fagositosis adalah aktivitas makrofag memangsa partikel atau mikroba, termasuk parasit, yang dianggap sebagai benda asing dalam tubuh. Aktivitas fagositosis makrofag diamati dengan uji

dengan kelompok kontrol negative. Hasil itu menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jinten hitam dapat meningkatkan aktifitas makrofag dalam memfagositosis benda asing.

Secara berturut – turut dari yang kecil ke yang lebih besar, prosentase fagositosis makrofag kelompok perlakuan adalah 49 % untuk dosis 1,8125 μ g dan 3 g, 52 % untuk dosis 0,06125 μ g, 59 % untuk dosis 0,3125 μ g dan 62 % untuk dosis 0,0125 μ g. Prosentase fagositosis makrofag pada



Gambar 1. Hasil kultur Makrofag mencit Swiss jantan yang diinfeksi *P. berghei*



Gambar 2. Makrofag mencit Swiss jantan dengan latex intrasel sebagai hasil aktivitas fagositosis setelah dinkubasi selama 10 menit dengan ekstrak etanol jinten hitam 0,0625 g/sumuran (C) dan 0,00125 g/sumuran (B)

kelompok control negative adalah sebesar 33 %. Dibandingkan dengan prosentase fagositosis makrofag pada kelompok kontrol (tanpa perlakuan), dosis ekstrak etanol jinten hitam 0,0125 µg menunjukkan hasil yang berbeda bermakna ($p:0,04$) dan dosis 0,06125 µg menunjukkan hasil yang berbeda sangat bermakna ($p:0,00$).

Minyak jinten hitam banyak mengandung minyak aromatik, trace elemen, enzim, asam lemak, vitamin dan mineral, termasuk juga omega 3 dan omega 6. Oleh karena itu minyak jinten hitam memiliki efek sebagai antikanker, antijamur dan imunostimulan (Mursito, 2002; Nickafar *etal*, 2003). Nigellamin, alkaloid yang diisolasi dari ekstrak metanol jinten hitam, terbukti mampu meningkatkan metabolisme lemak (Morikawa, 2004). Minyak atsiri dan senyawa alkaloid dari ekstrak air jinten hitam juga terbukti memiliki efek sebagai antibakteri (El Fatary, 1977).

Kandungan bioaktif jinten hitam juga memiliki efek sebagai imunomodulator. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa minyak jinten hitam memiliki efek sebagai imunostimulan. Pada mencit hamster yang diinduksi streptozotocin, minyak jinten hitam mampu menurunkan kadar gula darah dan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Farah *etal*, 2001). Pada mencit yang diinfeksi virus citomegalo murin (MCMV) minyak jinten hitam berhasil meningkatkan kadar interferon γ , jumlah sel CD4 dan memusnahkan virus dari limpa pada hari ke 10 pasca infeksi (Salem *etal*, 2001). Secara *in vitro*, fraksi protein jinten hitam terbukti dapat meningkatkan produksi IL-1 β dan TNF- α oleh PMN darah tepi, sebaliknya tidak berpengaruh terhadap IL-4 maupun IL-8 (Haq *etal*, 1999). Inkubasi 10 dan 30 menit ekstrak etanol NS pada makrofag secara *in vitro* juga meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Akrom, 2005). Ekstrak etanol NS banyak mengandung minyak non volatile, senyawa flavonoid, polifenol maupun alkaloid yang diduga memiliki efek sebagai imunostimulansia (Labadie, 1986; Subarnas, 1993; Ma'at, 1996; Liu, 2001; Kurniati, 2002; Ali *etal*, 2003).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol jinten hitam dosis 0,06125 µg memiliki efek peningkatan aktivitas fagositosis makrofag yang lebih baik dibandingkan dengan dosis lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. 1994. *Celluler and Molecular Immunology*. Second Ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company
- Akrom & Hidayati, T., 2004. Pengaruh inkubasi 10 dan 30 menit ekstrak etanol jinten hitam terhadap aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit Swiss jantan secara in vitro (belum dipublikasi).
- Ali, B., H., Blunden, G., 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytother Res.*, 17(4): 299 – 305.
- Baratawidjaja, K.G. 2000. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- El Fatatry, H., M., 1975. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds, *Pharmazie*, 30(2): 109-11.
- Farrah, K.M., 2001. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters.
- Fitri, L.K. 1996. *Kaitan antar kadar interferon ? dan Tumor Necrosis Factor dengan imunitas terhadap infeksi malaria*. Jogjakarta : Pasca Sarjana UGM
- Haq, A., Lobo, P.I., Al Tufail, M., Rama, N., R., Al Sedairy, S., T., 1999. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography, *Int. J. Immunopharmacol.*, 21(4):283-95
- Harijanto, P. N. (ed.) 2000. *Malaria epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis dan Penanganan*. Jakarta : EGC
- Kresno, S.B., 2001. *Imunologi : Dignosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. Keempat. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Labadie, R.P. 1986. *Immunomodulative activities by constituents and preparations of medicinal plants*. Surabaya : Makalah dipresentasikan pada Symposium on Research of Medicinal Plants and Expo Jamu
- Liu, J. Et al. 2001. *Genus Phyllanthus for Chronic hepatitis B virus infection : a systematic review*. *J. Viral Hepat*, 8, 5, 358 – 66
- Ma'at, S. 2001. *Obat Asli Untuk Pelayanan Kesehatan Formal*. Jember : Seminar sehari Potensi Tanaman Obat Indonesia dalam Menunjang Pelayanan Kesehatan dan Per-ekonomia Indonesia
- Mursito, 2002. *Ramuan tradisional untuk penyakit malaria*, Jakarta: Penebar Swadaya
- Nickavar B., Mojab, F., Javidnia, K., Amoli, M.,A, 2003. *composition of the fixed and volatile oils of Nigella sativa L. from Iran*, *J. Naturforsch.*, 58(9-10):629-31.
- Ratnaningsih, T. 2001 *Efek ekstrak polifenol teh hijau terhadap respon imun seluler mencit selama infeksi Salmonella typhimurium*. Jogjakarta, Pasca Sarjana UGM
- Salem, M.L. & Hossain, M.S., 2000. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection, *Int. J. Pharmacol.*, 22(9):729-40.
- Sangat, H.M., Zuhud, E.A.M. dan Damayanti, E.K. 2000. *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Idonesia* Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Supargiyono, 1993. Proteksi terhadap Infeksi Malaria yang fatal pada mencit dengan Vaksin Malaria Stadium Darah. *BIK* Jil. XXVI, 3, 125 – 136.
- Warren, K. S. (ed.) 1993. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection. Third Edition*. Oxford : Blackwell Scientific Publication.
- Wijayanti, M. A. 2000. Sekresi reactive oxygen intermediates oleh makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi selama infeksi Plasmodium berghei. *BIK*, 32, 2, 77 – 82.
- Wijayanti, M. A., Suprgiyono dan Fitri, L.K. 1999. Sekrei Tumor Necrosis Factor dan Reactive Oxygen Itermmediates oleh makrofag peritoneum mencit yang distimulasi dengan antigen terlarut Plasmodium Falciparum. *BIK.*, 31, 1, 23 – 27.
- Wijayanti, M. A. et al. 1997. Pengaruh imunitas mencit dengan parasit stadium eritrositik terhadap infeksi plasmodium berghei. *BIK.*, 28, 2, 53 – 9.