

# Minyak Buah Merah Meningkatkan Aktivitas Proliferasi Limfosit Limpa Mencit Setelah Infeksi *Listeria Monocytogenes*

(RED FRUIT OIL INCREASES SPLEEN LYMPHOCYTE PROLIFERATION  
IN MICE AFTER *Listeria monocytogenes* INFECTIONS)

<sup>1</sup>Ika Wahyuniari, <sup>2</sup>Marsetyawan HNE Soesatyo,  
<sup>2</sup>Muhammad Ghufro, <sup>2</sup>Yustina, <sup>2</sup>Andwi Ari Sumiwi, <sup>1</sup>Sri Wiryawan

<sup>1</sup>Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Udayana,  
Jl. PB Sudirman Denpasar 80232  
Telepon 0361(222510), Faks 0361(262046).  
Email: ikawahyuniari@yahoo.com  
<sup>2</sup>Bagian Histologi dan Biologi Sel,  
FK Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

## ABSTRACT

The success of individual in keeping healthy from infectious disease is closely related to the ability of their body immune responses against infectious agents. It is reported that one way to increase the immune responses is by system to antioxidant. Red fruit oil contains carotenoid and tocoferol that function as antioxidant. This study was aimed at investigating the effect of red fruit oil on spleen lymphocyte proliferation in mice infected with *Listeria monocytogenes*. Sixty female Balb/c mice were used in this study. The animals were randomly selected and divided into five groups, each group were 12 mice. The first and second groups received aquadest only, whereas the third, fourth, and fifth groups received red fruit oil with different doses, ie. 0.3, 0.6, and 1.2 mL/kgBW/day, respectively. Lymphocyte proliferation activities were tested by using 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay method. Lymphocyte proliferation assay demonstrated that there was significant difference between the groups with red fruit oil and aquadest, started at day 2 post-infection. The optical density (OD) values recorded at day 3 in groups I, II, III, IV, and V were  $0.769 \pm 0.025$ ,  $0.904 \pm 0.048$ ,  $1.110 \pm 0.020$ ,  $1.021 \pm 0.033$ ,  $0.979 \pm 0.002$ , respectively. The highest optical density (OD), ie.  $1.194 \pm 0.032$ , occurred at day 6 after receiving 0,3 mL/kgBW/day. In conclusion, red fruit oil could increase lymphocyte proliferation.

Key words: Red fruit oil, *Listeria monocytogenes*, Lymphocyte proliferation, mice

## PENDAHULUAN

Lingkungan di sekitar kita dipenuhi banyak agen infeksi yang dapat menyerang dan melakukan multiplikasi dalam tubuh kita sehingga menyebabkan penyakit infeksi. Oleh karena itu, tubuh harus membentuk serangkaian mekanisme pertahanan sebagai suatu respons yang terkoordinasi terhadap pengenalan substansi asing, yang kita kenal sebagai respons imun (Abbas *et al.*, 2000; Roitt, 2002).

Respons imun dapat ditingkatkan dengan mengkonsumsi makanan yang mengandung antioksidan, antara lain karotenoid, tokoferol, dan vitamin C. Salah satu bentuk karotenoid adalah  $\beta$ -karoten yang dapat meningkatkan respons imun, jumlah dan fungsi sel-sel yang

berperan dalam sistem imun (Massimino *et al.*, 2001; Silalahi, 2002). Menurut Bendich (1989),  $\beta$ -karoten dapat meningkatkan respons proliferasi limfosit T dan B, menstimulasi fungsi sel T efektor, dan meningkatkan kapasitas *tumorcidal* makrofag, sel T sitolitik, dan *natural killer cell* (sel NK). Suatu penelitian dengan pemberian vitamin E dapat meningkatkan proliferasi limfosit secara *in vitro* (Puthongsiriporn *et al.*, 2001), dan suplementasi dengan tokoferol, asam askorbat, dan vitamin B6 meningkatkan fungsi limfosit (Grimble, 1997). Pemberian asam askorbat dapat meningkatkan sitotoksitas sel NK (Vojdani dan Ghoneum, 1993). Antioksidan lain yang pernah diteliti adalah *lycopene*, suatu karotenoid utama dalam tomat dapat mengurangi kerentanan DNA limfosit terhadap

kerusakan oksidatif (Riso *et al.*, 1999; Porrini dan Riso, 2000).

Buah merah (*Pandanus conoideus* Lam) merupakan salah satu bahan makanan yang memiliki kandungan senyawa antioksidan yang sangat tinggi, yaitu karotenoid, tokoferol, dan vitamin C (Budi dan Paimin, 2004). Buah merah sangat populer bagi masyarakat Papua, dan termasuk tanaman endemik Papua yang banyak tumbuh di hutan-hutan. Secara turun-temurun buah merah menjadi salah satu makanan tradisional masyarakat Papua, dan sering digunakan dalam acara adat (Budi *et al.*, 2005). Agar khasiat dan manfaatnya dapat dirasakan oleh masyarakat di luar Papua, dan keawetannya dapat terjaga dalam waktu lama, maka buah merah diolah menjadi minyak buah merah (Yahya dan Wiryanta, 2005).

Secara empiris, minyak buah merah (*P. conoideus* Lam) telah digunakan untuk menanggulangi berbagai penyakit, antara lain: kanker, *stroke*, hipertensi, HIV/AIDS, hepatitis, sirosis hepatis, diabetes melitus, sinusitis, kista ovarium, epilepsi, dan kebutakan. Pada kasus AIDS, setelah pemberian minyak buah merah yang dikombinasi dengan mengkonsumsi 80% protein hewani setiap hari ternyata dapat meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> (Budi dan Paimin, 2004; Budi *et al.*, 2005).

Komponen respons imun yang berbeda sering bereaksi dengan cara yang berbeda terhadap mikroba yang berbeda, seperti bakteri intraselular dengan bakteri ekstraselular. Bakteri intraselular mempunyai kemampuan untuk bertahan dan bahkan bereplikasi dalam fagosit melalui berbagai mekanisme untuk menghindari sistem imun, misalnya *Listeria monocytogenes* yang akan merusak membran fagosom dan menuju sitoplasma. Oleh karena itu, bakteri intraselular tersebut resisten terhadap degradasi fagosit. Apabila respons imun alamiah gagal menghilangkan infeksi bakteri intraselular, maka diperlukan respons imun adaptif yang diperantarai oleh sel (*cell-mediated immunity*), yaitu limfosit T. Respons biologi awal limfosit T melalui fase pengenalan antigen, sehingga terjadi aktivasi limfosit T *naive*, yaitu proliferasi limfosit T yang spesifik terhadap antigen tersebut, dan differensiasi menjadi sel memori dan sel efektor (Abbas *et al.*, 2000).

*L. monocytogenes* merupakan bakteri gram positif bentuk batang dan bersifat patogen intraselular fakultatif. Bakteri tersebut telah banyak digunakan sebagai model bakteri dalam mempelajari penyakit infeksi bakteri

intraselular. Sifat-sifat *L. monocytogenes* telah diketahui dengan baik, sehingga dapat dipakai sebagai model bakteri yang paling baik untuk penyakit infeksi (Ziegler, 1999).

Dari uraian di atas, minyak buah merah mengandung antioksidan yang dapat meningkatkan respons imun. Peneliti menggunakan mencit yang diinfeksi bakteri intraselular untuk mengetahui pengaruh minyak buah merah terhadap proliferasi limfosit.

## METODE PENELITIAN

### Hewan Coba

Penelitian ini merupakan eksperimental *in vitro* dengan pola *Post test-Only Control group Design*. Mencit Balb/c betina sebanyak 60 ekor digunakan sebagai hewan coba mencit tersebut secara acak dibagi menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 12 mencit. Kelompok I dan II hanya mendapat aquadest dan kelompok III, IV, V mendapat minyak buah merah dengan dosis berturut-turut 0,3 mL/kgBB per hari; 0,6 mL/kgBB per hari; dan 1,2 mL/kgBB per hari. Awalnya hewan coba diberi aquadest atau minyak buah merah secara peroral menggunakan kanula intragastrikum setiap hari selama 14 hari, kemudian kelompok II, III, IV, dan V diinfeksi dengan *L. monocytogenes* dengan cara menyuntikkan secara intraperitoneal inokulum dengan dosis  $1 \times 10^3$ - $10^4$  CFU. Pada hari 0, 2, 3, 6 setelah inokulasi bakteri, 3 mencit dari masing-masing kelompok dikorbankan dengan narkose menggunakan kloroform untuk mendapatkan limfosit limpa.

### Isolasi dan Kultur Limfosit Limpa

Mencit dikorbankan menggunakan kloroform kemudian diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan selubung peritonealnya dibersihkan dengan mengolesi alkohol 70%. Selubung peritoneum dibuka, kemudian limpa diangkat dan diletakkan pada cawan petri steril diameter 50 mm yang telah diisi 5 mL medium RPMI 1640, kemudian medium disemprotkan ke dalam limpa untuk mendapatkan suspensi sel tunggal. Setelah itu, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 10 mL untuk disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 10 menit. Pellet yang didapat, diresuspensikan dalam 2 mL *Tris Buffered Ammonium Chlorid* untuk melisis eritrosit. Sel dicampur menggunakan pipet dan dikocok,

kemudian didiamkan pada suhu ruangan selama 2 menit. Ditambahkan 1 mL *Fetal Bovine Serum* pada dasar tabung menggunakan pipet. Suspensi tersebut disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit, dan supernatannya dibuang. *Pellet* dicuci dua kali dengan RPMI dengan cara dipipet berulang-ulang dan disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan *pellet* yang didapat diresuspensikan pada 4 mL medium komplet.

Suspensi sel dikultur pada cawan petri diameter 50 mm dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 2 jam. Supernatan yang berisi sel-sel limfosit diambil dengan menggunakan pipet dan ditampung dalam tabung sentrifus. Supernatan kemudian disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit. Supernatannya dibuang dan limfosit diresuspensikan dengan 1 mL medium komplet. Sel dihitung menggunakan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan *trypan blue* sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan 10<sup>6</sup> sel/mL (Mahardika, 2003).

#### Uji Proliferasi Limfosit dengan MTT Assay

Limfosit dikultur pada mikroplate 96 dengan volume 100 µL/sumuran. Tiap-tiap kelompok dengan replikasi tiga kali. Ditambahkan *phytohaemagglutinin* dengan konsentrasi akhir 50 µg/mL sebanyak 10 µL/sumuran, kemudian diinkubasi pada 37°C, CO<sub>2</sub> 5% selama 72 jam. Selanjutnya ditambahkan MTT (*3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*) pada masing-masing sumuran dengan konsentrasi 5 mg/mL sebanyak 10 µL, dan diinkubasi pada 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, dilanjutkan selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan menambah HCl-isopropanol 0,04 M sebanyak 100 µL/sumuran. Hasilnya dibaca dengan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *reader* (Chapdelaine, 2001).

#### Analisis data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan uji *one-way Anova*. Jika ada perbedaan bermakna, akan dilanjutkan dengan *Tuckey's HSD test* untuk membandingkan rata-rata data yang diperoleh antar kelompok perlakuan.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu cara uji kolorimetris kuantitatif untuk proliferasi sel adalah MTT *assay*, yang tergantung pada reduksi garam tetrazolium

MTT oleh dehidrogenase mitokondria sel viabel untuk membentuk produk formazan biru yang jumlahnya setara dengan jumlah sel hidup yang terdapat dalam kultur (Chapdelaine, 2001).

Pada penelitian ini, uji proliferasi limfosit dengan MTT *assay* akan didapat nilai rerata OD dari masing-masing kelompok (Tabel 1). Rataan OD antara kelima kelompok tidak ada perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ) pada hari ke-0 setelah infeksi *L.monocytogenes*. Hal tersebut terjadi karena respons imun adaptif baru akan bekerja apabila respons imun bawaan tidak mampu mengeliminasi mikroba, yaitu mulai hari ke-1 pascainfeksi (Abbas *et al.*, 2000). Peningkatan proliferasi limfosit pada hari ke-2 pascainfeksi sudah mulai tampak pada kelompok mencit yang mendapat minyak buah merah bila dibandingkan dengan mencit yang mendapat aquadest maupun mencit yang mendapat aquadest dan diinfeksi dengan *L.monocytogenes*. Mencit yang mendapat aquadest dan diinfeksi *L.monocytogenes* memiliki aktivitas proliferasi limfosit yang lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang hanya mendapat aquadest, tapi tidak ada perbedaan yang bermakna.

Peningkatan aktivitas proliferasi limfosit sudah terlihat pada hari ke-3 pascainfeksi, yaitu pada kelompok II, III, IV, dan V (Gambar 1). Perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) tampak pada masing-masing kelompok pada hari ke-3 pascainfeksi, kecuali antara kelompok III dengan IV dan antara kelompok IV dengan V. Peningkatan proliferasi limfosit yang paling tinggi terdapat pada kelompok III dan yang paling rendah tampak pada kelompok II. Hal tersebut menunjukkan proliferasi limfosit pada kelompok mencit yang mendapat buah merah lebih tinggi daripada kelompok mencit yang tidak mendapat buah merah.

Pada kelompok mencit yang mendapat aquadest dan diinfeksi *L. monocytogenes*, mulai terjadi kematian pada hari ke-2 pascainfeksi yaitu sebanyak 3 ekor, dan hari ke-3 pascainfeksi sebanyak 2 ekor. Oleh karena itu hanya terdapat satu mencit yang masih hidup pada hari ke-3 pascainfeksi. Namun, lima mencit masih bisa diambil karena mencit-mencit tersebut belum lama mati (belum kaku) dan limfosit limpa yang diisolasi masih banyak yang hidup. Sedangkan untuk kelompok IV dan V, kematian terjadi pada hari ke-4 dan hari ke-5 pascainfeksi. Oleh karena itu, pada hari ke-6 pascainfeksi tidak didapatkan data untuk kelompok II, IV, dan V.

Tabel 1. Nilai OD pada limfosit limpa mencit setelah pemberian minyak buah merah pada mencit yang diinfeksi *L. monocytogenes*.

| Kelompok                       | Mencit | Aktivitas Proliferasi Limfosit (Hari) |         |         |        |
|--------------------------------|--------|---------------------------------------|---------|---------|--------|
|                                |        | 0                                     | 2       | 3       | 6      |
| I<br>Kontrol<br>negatif        | 1      | 0,703                                 | 0,778   | 0,743   | 0,720  |
|                                | 2      | 0,674                                 | 0,729   | 0,792   | 0,760  |
|                                | 3      | 0,578                                 | 0,808   | 0,771   | 0,706  |
|                                | Rerata | 0,652                                 | #0,772  | #0,769* | #0,728 |
|                                | SB     | 0,065                                 | 0,040   | 0,025   | 0,028  |
| II<br>Kontrol<br>Positif       | 1      | 0,746                                 | 0,826   | 0,856   | †      |
|                                | 2      | 0,754                                 | 0,885   | 0,904   | †      |
|                                | 3      | 0,672                                 | 0,776   | 0,952   | †      |
|                                | Rerata | 0,724                                 | 0,829*  | #0,904* | -      |
|                                | SB     | 0,045                                 | 0,055   | 0,048   | -      |
| III<br>Buah<br>merah 0,3<br>mL | 1      | 0,691                                 | 0,942   | 1,127   | 1,219  |
|                                | 2      | 0,794                                 | 1,037   | 1,088   | 1,158  |
|                                | 3      | 0,659                                 | 1,165   | 1,113   | 1,206  |
|                                | Rerata | 0,715                                 | #1,048* | #1,110* | #1,194 |
|                                | SB     | 0,070                                 | 0,112   | 0,020   | 0,032  |
| IV<br>Buah<br>merah 0,6<br>mL  | 1      | 0,788                                 | 1,029   | 0,984   | †      |
|                                | 2      | 0,616                                 | 1,028   | 1,030   | †      |
|                                | 3      | 0,612                                 | 0,918   | 1,049   | †      |
|                                | Rerata | 0,672                                 | #0,992  | #1,021* | -      |
|                                | SB     | 0,101                                 | 0,064   | 0,033   | -      |
| V<br>Buah<br>merah 1,2<br>mL   | 1      | 0,524                                 | 0,920   | 0,977   | †      |
|                                | 2      | 0,533                                 | 0,976   | 0,978   | †      |
|                                | 3      | 0,606                                 | 0,931   | 0,982   | †      |
|                                | Rerata | 0,554                                 | 0,942   | #0,979* | -      |
|                                | SB     | 0,045                                 | 0,030   | 0,002   | -      |

Keterangan: † = mencit mati.

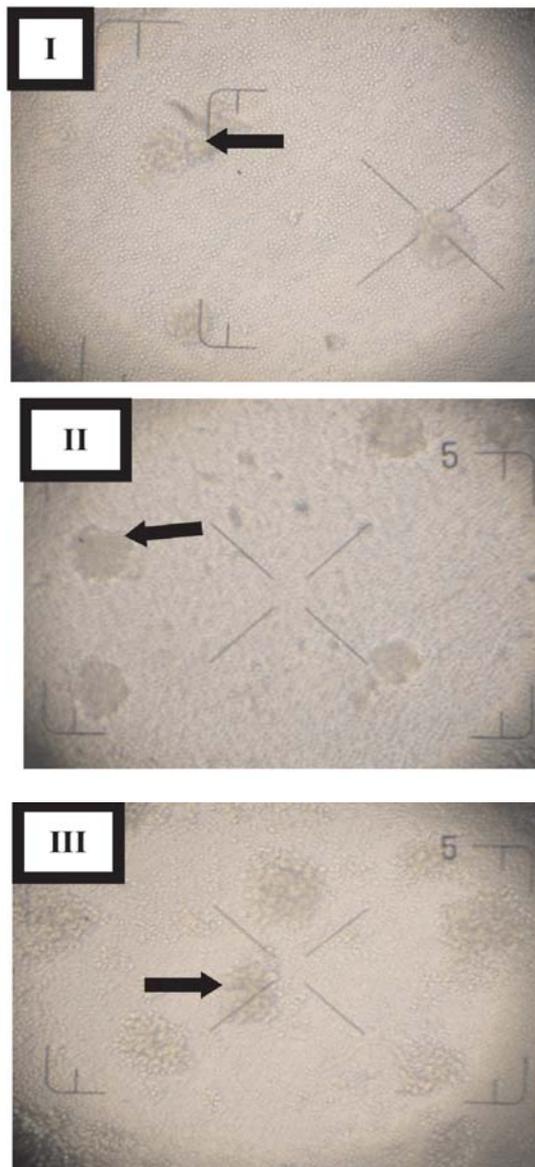
# = terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok I.

\* = terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok II.

- = rerata tidak bisa dihitung.

Pada hari ke-6 pascainfeksi hanya didapatkan data kelompok I dan III, tampak rerata nilai OD pada stimulasi limfosit limpa kelompok III paling tinggi dibandingkan dengan hari-hari sebelumnya yaitu mencapai  $1,194 \pm 0,032$  dan berbeda bermakna dengan kelompok I. Tipe limfosit yang berproliferasi tidak diketahui, namun diduga limfosit T yang berproliferasi karena pada infeksi bakteri intraselular termasuk infeksi *L. monocytogenes* akan memicu respons imun selular. Limfosit T yang teraktivasi akan mensekresikan IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma) yang selanjutnya mampu meningkatkan aktivitas makrofag dalam mengeliminasi mikroba. Semakin meningkat

aktivitas limfosit T, maka semakin meningkat pula kemampuan makrofag dalam mengeliminasi mikroba. Begitu pula sebaliknya, makrofag mensekresikan IL-12 (Interleukin-12) yang selanjutnya mampu meningkatkan diferensiasi limfosit T *helper*. Limfosit T *helper* juga akan mensekresikan IL-2 yang menstimulasi proliferasi dan diferensiasi limfosit T sitolitik. Di samping itu, limfosit T *helper* akan mengekspresikan CD40L, yang akan berikatan dengan CD40 pada makrofag dan mengaktivasi makrofag tersebut agar lebih efisien dalam menstimulasi diferensiasi limfosit T sitolitik sehingga dapat melisis sel yang terinfeksi *L. monocytogenes* (Abbas *et al.*, 2000; Roitt, 2002).



Gambar 1. Proliferasi limfosit limpa mencit yang mendapat aquadest (kelompok I), aquadest dan diinfeksi *L. monocytogenes* (kelompok II), dan minyak buah merah dengan dosis 0,3 mL/kgBB (kelompok III) pada hari ke-3 pascainfeksi dengan perbesaran 400x. Pada kelompok yang mendapat minyak buah merah tampak peningkatan aktivitas proliferasi.

Kelompok mencit yang mendapat aquadest dan diinfeksi *L. monocytogenes* mati pada hari ke-2 pascainfeksi. Terdapat perbedaan dengan pendapat Ziegler (1999) bahwa infeksi *L. monocytogenes* paling hebat terjadi sekitar hari ke-3 atau ke-4 pascainfeksi, sehingga mencit yang daya tahan tubuhnya kurang baik mengalami kematian pada hari ke-3 atau ke-4. Hal tersebut karena kondisi mencit dan

lingkungan pemeliharaan mencit yang berbeda. Walau pun demikian, mencit yang mendapat minyak buah merah memiliki daya tahan tubuh yang lebih baik daripada mencit yang tidak mendapat minyak buah merah. Ini dibuktikan bahwa pada kelompok mencit yang mendapat minyak buah merah ada yang mati pada hari ke-4 pascainfeksi. Bahkan kelompok mencit yang mendapat minyak buah merah dengan dosis 0,3 mL/kgBB/hari tetap hidup pada hari ke-6 pascainfeksi. Tidak menutup kemungkinan mencit pada kelompok tersebut tetap bertahan pada hari-hari berikutnya karena tidak menunjukkan gejala-gejala sakit.

Pada hari ke-6 pascainfeksi, kondisi fisik kelompok mencit yang mendapat minyak buah merah dosis 0,3 mL/kgBB/hari tidak menunjukkan gejala-gejala sakit. Nafsu makannya masih seperti biasa dan gerakannya tetap lincah seperti pada mencit kelompok I yang hanya mendapat aquadest. Dengan demikian mencit kelompok III mampu mengeliminasi bakteri intraselular melalui respons imun selularnya. Lain halnya dengan mencit kelompok lain yang diinfeksi *L. monocytogenes* mengalami penurunan nafsu makan, dan gerakannya lambat. Hal tersebut didukung oleh pendapat Ziegler (1999) bahwa mencit yang sehat dan memiliki daya tahan tubuh yang baik akan mengalami pemulihan ke keadaan yang normal pada hari ke-7 atau ke-8 pascainfeksi.

Peningkatan respons imun selular ini bisa disebabkan karena kandungan  $\beta$ -karoten dan  $\alpha$ -tokoferol yang terdapat dalam buah merah. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa  $\beta$ -karoten dapat meningkatkan respons imun, jumlah dan fungsi sel-sel yang berperan dalam sistem imun (Silalahi, 2002; Massimino *et al.*, 2001). Antioksidan karotenoid (Chew dan Park, 2004) dan  $\alpha$ -tokoferol (Massimino *et al.*, 2001) juga berperan dalam stabilitas membran sel dan melindungi komponen selular dari kerusakan oksidatif. Penelitian yang telah dilakukan oleh Puthongsiriporn *et al.*, (2001) juga menunjukkan bahwa pemberian vitamin E dapat meningkatkan proliferasi limfosit secara *in vitro*. Di samping itu, vitamin E juga dapat menghambat apoptosis sel T dengan menekan aktivitas faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan AP-1, sehingga menghambat ekspresi mRNA CD95L (Weber *et al.*, 2002).

Pada penelitian ini, terjadi sedikit penurunan respons imun selular pada mencit yang mendapat minyak buah merah sebanyak 0,6 dan 1,2 mL/kgBB/hari dibandingkan dengan

mencit yang mendapat minyak buah merah sebanyak 0,3 mL/kgBB/hari. Walau pun demikian, respons imun selularnya tetap lebih tinggi daripada kelompok yang mendapat aquadest (kelompok I dan II). Semakin meningkat dosis minyak buah merah, makrofag akan semakin teraktivasi. Molekul mikrobisidal berupa radikal bebas semakin banyak dibentuk oleh makrofag. Molekul mikrobisidal ini sangat reaktif merusak mikroba. Namun, bila pelepasan molekul mikrobisidal sangat tinggi, mampu merusak jaringan penjamu normal karena produk mikrobisidal makrofag tidak dapat membedakan antara jaringan penjamu dengan mikroba (Abbas *et al.*, 2000; Roitt, 2002).

Selain akibat pembentukan molekul mikrobisidal yang berlebihan, penurunan respons imun selular pada mencit yang mendapat minyak buah merah sebanyak 0,6 dan 1,2 mL/kgBB/hari, bisa disebabkan oleh kandungan antioksidan yang terdapat dalam minyak buah merah, terutama  $\alpha$ -tokoferol. Dalam konsentrasi tinggi,  $\alpha$ -tokoferol bisa berkembang menjadi prooksidan. Mekanisme utama aktivitas antioksidan  $\alpha$ -tokoferol dengan menginaktivasi 1 radikal ( $R^0$ ) oleh 1 molekul  $\alpha$ -tokoferol (TocH) dengan reaksi  $TocH + R^0 \rightarrow RH + Toc^0$ . Pada kondisi oksidatif ringan, aktivitas prooksidan  $\alpha$ -tokoferol berasal dari propagasi rantai oleh radikal  $\alpha$ -tocopheroxyl ( $Toc^0$ ). Radikal  $Toc^0$  secara langsung mampu mengoksidasi lipid (LH) sehingga terbentuk radikal lipid ( $L^0$ ) dengan reaksi  $Toc^0 + LH \rightarrow TocH + L^0$ . Aktivitas prooksidan  $\alpha$ -tokoferol dapat dicegah dengan mengeliminasi radikal  $Toc^0$  melalui daur ulang secara langsung menjadi  $\alpha$ -tokoferol yang diperantarai oleh *co-antioxidant* seperti asam askorbat. Dengan demikian  $\alpha$ -tokoferol akan selalu berfungsi sebagai antioksidan jika konsentrasi *co-antioxidants* cukup tinggi. Namun, pada kondisi oksidatif hebat, terjadi inaktivasi radikal yang kedua oleh radikal  $Toc^0$  dengan reaksi  $Toc^0 + R^0 \rightarrow$  produk non radikal. Pada kondisi ini,  $\alpha$ -tokoferol sebagai antioksidan tidak tergantung dengan adanya askorbat (Kontush *et al.*, 1996).

Buah merah masih mengandung vitamin C, sedangkan pada minyak buah merah tidak mengandung vitamin C. Kemungkinan besar prooksidan yang terbentuk dari vitamin E tidak bisa kembali lagi ke bentuk asalnya. Vitamin E (tokoferol atau tokotrienol) dapat membentuk

prooksidan (*tocopheroxyl* atau *tocotrienoxyl*) setelah memakan radikal bebas, namun bisa kembali lagi ke bentuk asalnya (tokoferol atau tokotrienol). Proses tersebut dikatalisis secara langsung oleh vitamin C dan secara tidak langsung melalui antioksidan *thiol*, seperti *glutathione* dan *lipoic acid* yang meregenerasi vitamin E melalui vitamin C (Packer *et al.*, 2001). Walau pun demikian, kerusakan akibat prooksidan ini hanya terjadi pada dosis yang sangat tinggi, yaitu >1000 mg/hari (Anonim, 1998) atau 133 kali lebih tinggi dari dosis yang biasa digunakan oleh masyarakat.

Minyak buah merah telah digunakan secara empiris oleh masyarakat untuk mengatasi berbagai penyakit. Pada penelitian tersebut, sudah terbukti secara *in vitro* bahwa minyak buah merah dapat meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit limpa yang kemungkinan dapat mengeliminasi bakteri intraselular, yaitu *L. monocytogenes*. Namun, tidak menutup kemungkinan minyak buah merah juga berperan dalam meningkatkan respons imun terhadap infeksi mikroba jenis lainnya.

## SIMPULAN

Aktivitas proliferasi limfosit limpa meningkat setelah pemberian minyak buah merah (*P. conoideus* Lam) pada mencit yang diinfeksi *L. monocytogenes*. Peningkatan aktivitas proliferasi tertinggi terdapat pada mencit yang mendapat minyak buah merah sebanyak 0,3 mL/kgBB/hari, kemudian diikuti dengan dosis 0,6 mL/kgBB/hari, dan 1,2 mL/kgBB/hari. Dengan demikian minyak buah merah dapat meningkatkan respons imun selular pada mencit.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian selanjutnya mengenai pengaruh minyak buah merah terhadap respons imun humoral. Apabila telah diketahui pengaruh minyak buah merah terhadap respons imun selular dan humoral melalui uji *in vivo* dan uji klinik, dapat digunakan sebagai landasan penggunaan minyak buah merah sebagai imunomodulator.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan tarima kasih kepada Laboratorium Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada, dan Bagian Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran, UGM atas fasilitas dan bimbingan yang diberikan hingga penelitian ini dapat diselesaikan seperti harapan kami.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Pennsylvania. WB Saunders Co.
- Bendich A. 1989. Carotenoids and the Immune Responce. *J Nutr* 119(1):112-115.
- Budi M dan Paimin FR. 2004. *Buah Merah*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Budi M, Hartono R, Setyanova I. 2005. *Tanya Jawab Seputar Buah Merah*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Chapdelaine JM. 2001. *MTT Reduction-A Tetrazolium-Based Colorimetric Assay for Survival and Proliferation*. Pharmakon Research International, Inc. Waverly, PA.
- Chew BP and Park JS. 2004. Carotenoid Action on the Immune Response. *J Nutr* 134:257S-261S.
- Grimble RF. 1997. Effect of Antioksidant Vitamin on Immune Function with Clinical Applications. *Int J Vitam Nutr Res* 67(5):312-320.
- Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlscutter A, Beisiegel U. 1996. Antioxidant and Prooxidant Activity of  $\alpha$ -Tocopherol in Human Plasma and Low Density Lipoprotein. *J Lipid Res* 37:1436-1448.
- Mahardika AW. 2003. *Kultur Sel*. Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Massimino SP, Daristotle L, Ceddia MA, Hayek MG. 2001. *The Influence of Diet on the Puppy's Developing Immune System*. Lewisburg, Ohio: Research and Development Division the Lams Co.
- Packer L, Weber SU, Rimbach G. 2001. Molecular Aspects of  $\alpha$ -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. *J Nutr* 131:369S-373S.
- Porrini M, Risso P. 2000. Lymphocyte Lycopene Concentration and DNA Protection from Oxidative Damage is Increased in Women after Short Period of Tomato Consumption. *J Nutr* 130:189-192.
- Puthongsiriporn U, Scheideler SE, Sell JL, Beck MM. 2001. Effects of Vitamin E and C Supplementation on Performance, In Vitro Lymphocyte Proliferation, and Antioxidant Status of Laying Hens during Heat Stress. *Journal Series, Nebraska Agricult. Res. Div* 1190-1200.
- Riso P, Pinder A, Santangelo A, Porrini M. 1999. Does Tomato Consumption Effectively Increase the Resistance of Lymphocyte DNA to Oxidative Damage? *Am J Clin Nutr* 69:712-718.
- Roitt IM. 2002. *Imunologi*. Ed 8. Jakarta. Widya Medika.
- Silalahi J. 2002. Anticancer and Health Protective Properties of Citrus Fruit components. *Asia Pasific J Clin Nutr* 11(1):79-84.
- Vojdani A, Ghoneum M. 1993. In Vivo Effect of Ascorbic Acid on Enhancement of Human Natural Killer Cell Activity. *Nutrition Research* 13:753-764.
- Weber ML, Weigand MA, Giaisi M, Suss D, Treiber MK, Baumann S, Ritsou E, Breikreutz R, Krammer PH. 2002. Vitamin E Inhibits CD95 Ligand Expression and Protects T Cells from Activation-Induced Cell Death. *J Clin Invest* 110:681-690.
- Yahya HM, Wiryanta TW. 2005. *Khasiat dan Manfaat Buah Merah*. Jakarta. PT AgroMedia Pustaka.
- Ziegler HK. 1999. *Correlating Host Resistance and Susceptibility with Biomarkers from in vitro, ex vivo and Animal Models*, In: Food Safety Initiative Technical Workshop. Atlanta, 4 August 1999.