

PENGGUNAAN EKSTRAK FERMENTASI BERAS DARI BEBERAPA JENIS *Monascus purpureus* UNTUK AKTIVITAS INVITRO FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG DAN POLIMORFONUKLEAR PERITONEUM MENCIT SEBAGAI IMMUNOMODULATOR*

[In Vitro Phagocytotic Activities of Macrophage and Polymorphonuclear Cell as Immunomodulator Effect of Rice Fermentation Extract by using Several Strains of *Monascus purpureus*]

T Yulinery✉ dan N Nurhidayat
Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Jln Raya Bogor Jakarta km 46 Cibinong;
e-mail: *tyulinery@yahoo.co.id*

ABSTRACT

Fermentation of rice by *Monascus purpureus* could produce red yeast rice (anggak) that can be used as drugs to decrease cholesterol and triglycerides increase thrombocyt in patients of dengue fever. To increase the immune system is needed the compounds that can be produced by microorganisms. The aim of study is to know that several strains of *Monascus purpureus* could produce the immunomodulatory effects or not. The study is about the invitro of phagocytotic activities of macrophage cell and polymorphonuclear of mice. This study had been used the fermented rice extract of five concentration such as 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml and 0.0001 mg/ml. As positive control was used 5 mg/ml extracts of meniran herbal, suspension of *Staphylococcus aureus* and the liquid of mice peritoneum. The results showed that the extract of fermented rice of *Monascus purpureus* with 1 mg/ml concentration was the same effectiveness as positive control. The conclusion was the extract of fermented rice could increase the fagocyticy activities of can be concluded that administration of extract some kind of *Monascus purpureus* to increase the phagocytosis activities of macrophages and polymorphonuclear cells of mice.

Key words: *Monascus purpureus*, macrophage, polymorphonuclear.

ABSTRAK

Monascus purpureus melalui proses fermentasi menghasilkan produk angkak. Angkak banyak digunakan sebagai obat untuk menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida dalam darah serta meningkatkan trombosit pada penderita demam berdarah. Untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh dibutuhkan senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan sistem imun, terutama yang diperoleh dari mikroorganisma. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah beras fermentasi dari beberapa jenis *Monascus purpureus* mempunyai efek imunomodulator. Penelitian ini menggunakan ekstrak air beras fermentasi beberapa sumber *Monascus purpureus* dengan konsentrasi 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml dan 0,0001 mg/ml. Sebagai pembanding digunakan ekstrak air herba meniran dengan konsentrasi 5 mg/ml dan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* serta cairan peritoneum mencit. Pengujian dilakukan terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag dan polimorfonuklear peritoneum mencit secara in vitro. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak fermentasi beras beberapa sumber *Monascus purpureus* dengan konsentrasi 1 mg/ml memiliki efektifitas yang sebanding dengan pembanding (ekstrak herba meniran). Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak beras fermentasi beberapa jenis *Monascus purpureus* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag dan polimorfonuklear peritoneum mencit secara in vitro.

Kata kunci: *Monascus purpureus*, makrofag, polimorfonuklear

PENDAHULUAN

Monascus purpureus merupakan kapang yang mengandung berbagai bahan bioaktif. Kapang ini melalui proses fermentasi dengan substrat beras dapat memproduksi angkak, yang banyak digunakan sebagai obat demam berdarah dengan meningkatkan sistem imun spesifik dan meningkatkan jumlah trombosit (Anonim, 2008). *M. purpureus* juga menghasilkan bahan bioaktif lovastatin dan asam aminobutirat (GABA), kedua bahan bioaktif tersebut sangat penting dalam perkembangan biomedis (Altieri, 2001), memiliki aktivitas menghambat bakteri gram positif seperti *Bacillus*, *Streptococcus*

dan *Pseudomonas* (Erdogru dan Azirak, 2004).

Metode yang digunakan dalam penarikan zat aktif pada angkak adalah metode ekstraksi (Departemen Kesehatan, 1995). Penelitian ini menggunakan ekstrak air karena secara umum angkak disajikan dengan diseduh air hangat dan dosis angkak bubuk minimal 14-54 g tiap hari diberikan pada penderita demam berdarah (Dennis dan Marks, 2006)

Aktivitas sistem kekebalan tubuh dapat menurun karena berbagai faktor diantaranya karena usia atau penyakit. Adanya senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan sistem imunitas sangat membantu untuk mengatasi penurunan sistem kekebalan tubuh

dan senyawa senyawa tersebut dapat diperoleh dari mikroorganisme (Kresno, 2001). Oleh karena itu sangat diperlukan penelitian dari hasil metabolit sekunder *Monascus purpureus* untuk menguji aktivitas immunomodulatornya.

Immunomodulator merupakan obat yang dapat mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan (Baratawidjaja, 2002). Berdasarkan penelitian sebelumnya pada hiperkolesterolemia pemberian ekstrak dengan kadar lovastatin 0,2% dapat menurunkan kolesterol plasma mencit sebesar 20,6% (Kurnianto, 2008). Penelitian pemberian ekstrak ekstrak sebesar 0,1 g/hari dengan berat tikus 200-250 g telah diuji secara in vivo dapat meningkatkan jumlah trombosit (Triana dan Nurhidayat, 2006). Meningkatnya trombosit berkaitan dengan meningkatnya sistem imun dan zat di dalam ekstrak yang diduga sebagai immunomodulator yaitu lovastatin yang dapat menstimulasi sistem imun (Anonim, 2008).

Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena itu dapat memberikan respon langsung (Mayer, 2011).

Makrofag merupakan sel besar dengan nucleus melipat atau melekuk mengandung kromatin halus menyerupai benang sitoplasma dan biasanya mengandung granula azurofilik yang halus. Sel ini merupakan sel serba guna yang terletak pada jaringan dan memproduksi susunan luas bahan kimia termasuk enzim, protein komplemen dan faktor pengaturan seperti interleukin 1. Makrofag berfungsi ganda yaitu sebagai imunitas alamiah dan imunitas spesifik. Makrofag juga mensekresi produk biologik secara aktif, diantaranya adalah IL-1 yang mengatur tugas sel-T dan sel-B serta memobilisasi sistem pertahanan tubuh lainnya. Sel-sel ini diproduksi di sumsum tulang dari sel induk myeloid melalui stadium promonosit. Sel yang matang kemudian masuk ke dalam aliran darah sebagai monosit dan apabila sel ini meninggalkan sirkulasi dan sampai di jaringan ia mengalami berbagai perubahan tambahan kemudian

menetap di jaringan sebagai makrofag. Monosit atau makrofag mempunyai waktu paruh kira-kira 3 bulan (Kresno, 2001; Hargono, 2008).

Proses penyerapan dan eliminasi mikroba atau partikel lain oleh sel sel khusus (fagosit) yang disebut dengan fagositosis, terjadi setelah bakteri melekat pada permukaan makrofag akan membentuk sitoplasma dan melekuk ke dalam bakteri. Sel-sel fagosit harus berada dalam jarak dekat dengan partikel atau antigen sasaran sehingga memudahkan sel tersebut difagositosis. Pada mamalia fagositosis dilakukan oleh sel-sel spesifik seperti polimorfonuklear (PMN), monosit dan makrofag yang ketiganya disebut sel-sel fagositik profesional. PMN merupakan garis depan pertahanan internal inang dan jumlahnya terbanyak. Sel PMN dapat melekat dan menembus sel endotel yang melapisi pembuluh darah. Sel ini terdiri dari 3 fagosit yaitu neutrofil, eosinofil dan basofil. Fagosit biasanya berpatroli mencari patogen tetapi dapat dipanggil ke lokasi spesifik oleh sitokin. Ketika patogen ditelan oleh fagosit, patogen terperangkap di vesikel intraseluler dan saling menyatu membentuk fagolisosom. Patogen dibunuh oleh aktivitas enzim pencernaan atau *respiratory burst* yang mengeluarkan radikal bebas ke fagolisosom. Terbentuknya senyawa-senyawa yang menghasilkan oksigen reaktif oleh PMN dapat diketahui secara in vitro. Hidup sel PMN hanya beberapa hari (2-3 hari) dan setiap harinya sekitar 10^{11} polimorf menghilang, namun digantikan oleh yang baru dari sum-sum tulang. Saat terjadi fagositosis, PMN akan melepaskan beberapa enzim antimikroba yang dapat menghancurkan mikroba yang ditelan oleh PMN, enzim ini dilepaskan dari granul, zat-zat utama yang ikut berperan dalam proses pembunuhan mikroba melalui proses fagositosis oleh PMN adalah senyawa-senyawa yang dapat menghasilkan oksigen reaktif seperti anion superoksida, hydrogen peroksida, radikal hidrosil dan hipoklorit.

Sebagai bakteri uji digunakan *Staphylococcus aureus*, merupakan bakteri gram positif, berbentuk coccus, dapat menyebabkan infeksi baik pada manu-

sia maupun hewan, tidak bersifat invasive, non hemolitik, berwarna putih dan tidak membentuk koagulasi. Sebagai hewan percobaan digunakan mencit karena merupakan hewan nokturna, ukuran lebih kecil, mudah dipelihara. Berat badan dewasa berkisar antara 20-40 g (Anonim, 1986).

Sebagai immunomodulator pembanding digunakan meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Hasil riset praklinik (Anonim, 2005) menunjukkan ekstrak *Phyllanthus niruri* L. dapat memodulasi sistem imun lewat proliferasi dan aktivasi limfosit T dan B serta sekresi beberapa sitokin spesifik. Dari hasil uji dapat digunakan sebagai terapi penyakit infeksi akut seperti TBC, hepatitis, ISPA, herpes zoster, dan sebagainya. Di samping itu skrining bioaktivitas immunomodulasi herba meniran dalam bentuk infus yang dilakukan oleh Puslitbang Obat Tradisional Universitas Airlangga dilaporkan sari air herba meniran mempunyai aktivitas biologi immunomodulasi. Infus secara in vivo meningkatkan kerja sistem fagositosis lebih dari 1,5 kali dari kontrol serta meningkatkan terbentuknya immunoglobulin (IgM dan IgG), namun tidak berpengaruh pada jumlah populasi limfosit total dan limfosit T. Secara in vitro infus dapat menghambat kerja sistem komplemen.

Penelitian mengenai immunomodulator dari mikroorganisme dan kandungan kimianya belum banyak diketahui sedangkan kebutuhan obat tradisional terus meningkat. Untuk mencari bahan baku obat sebagai immunomodulator, diperlukan pencarian dan pengembangan potensi sumber daya alam Indonesia terutama yang berasal dari mikroba, sehingga dapat dijadikan sumber bahan baku obat. Berdasarkan uraian di atas maka penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas in vitro fagositosis sel makrofag dan polimorfonuklear peritonium mencit dari ekstrak fermentasi beras beberapa jenis *Monascus purpureus* yang diduga mempunyai potensi sebagai immunomodulator. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang manfaat dan penggunaan ekstrak fermentasi beras oleh *Monascus purpureus* sebagai immunomodulator.

BAHAN DAN METODA

Peremajaan Biakan

Kapang *M. purpureus* JMBa, AS dan TST serta bakteri *Staphylococcus aureus* berasal dari koleksi Mikrobiologi LIPI. Kapang ditumbuhkan dalam media agar MEA (Malt Extract Agar) miring kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 14 hari sedangkan bakteri ditumbuhkan dalam media LB (Luria Bertani) agar miring kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

Penyiapan Media untuk fermentasi

Substrat yang digunakan adalah beras sebanyak 500 gram direndam selama 1 jam kemudian dicuci dan dikering anginkan kemudian dimasukan kedalam 20 petridish masing-masing petridish sebanyak 25 gram. Kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C lalu didinginkan. Beras yang sudah steril diinokulasi dengan biakan *M. purpureus* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C didalam inkubator selama 14 hari. Beras hasil fermentasi dikeringkan di dalam oven dengan suhu 60°C selama 12 jam. Hasil fermentasi yang sudah diinkubasi berupa angkak, kemudian dihaluskan. Tepung angkak tersebut akan digunakan untuk uji immunomodulator.

Pembuatan Ekstrak Air serbuk angkak

Pembuatan Ekstrak Air serbuk angkak menggunakan metode infus dengan cara ditimbang angkak sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam akuades steril hangat sebanyak 10 ml, didiamkan selama 15 menit. Kemudian disaring, ekstrak air yang didapat dibuat dengan variasi konsentrasi tertentu untuk dilakukan pengujian terhadap aktivitas immunomodulator.

Uji Immunomodulator

Aklimatisasi hewan coba mencit (Anonim, 2004)

Sebelum hewan coba digunakan, terlebih dahulu diadaptasikan terhadap lingkungan dan dilakukan penimbangan berat badan setiap harinya diamati kondisi kesehatannya. Hewan coba

diaklimatisasi selama 14 hari, hewan coba hanya diberi makan dan minum saja.

Penyiapan ekstrak uji

Disiapkan tabung kosong yang akan digunakan untuk pengujian tiap-tiap ekstrak. Masing-masing dibuat dengan konsentrasi 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml dan 0,0001 mg/ml tiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Angkak ditimbang 10 mg dan dilarutkan dalam 10 ml akuades steril untuk membuat stok larutan induk dengan konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan konsentrasi 1 mg/ml dipipet 0,5 ml ekstrak angkak kemudian ditambahkan 4,5 ml akuades steril sehingga didapat konsentrasi 0,1 mg/ml. Dari larutan konsentrasi 0,1 mg/ml dipipet 0,5 ml ekstrak angkak kemudian ditambahkan 4,5 ml akuades steril sehingga didapatkan konsentrasi 0,01 mg/ml, demikian seterusnya hingga didapatkan konsentrasi akhir 0,0001 mg/ml.

Persiapan suspensi bakteri uji

Medium suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* adalah Luria Bertani (LB). Bakteri dari biakan murni diambil satu ose kemudian ditumbuhkan dalam media LB cair sebanyak 50 ml lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diukur serapan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. Untuk mendapatkan jumlah bakteri 10^9 dilakukan pengenceran dengan larutan NaCl fisiologis 0,85%.

Pengambilan Sel Makrofag dan Sel PMN Peritoneum Mencit (Dey dan Harborne, 1991; Anonim, 2004)

Mencit dieuthanasia dengan menggunakan eter (masukkan ke dalam toples yang berisi kapas yang telah dibasahi eter) lalu diletakkan pada papan bedah. Pada bagian perut dibersihkan dengan ethanol 70% dan dibedah bagian perut menggunakan alat bedah steril. Jika ditemukan cairan peritoneum dalam jumlah sedikit pada perut lalu ditambahkan atau disempatkan larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) steril sebanyak 1-2 ml, kemudian diaduk

dengan hati-hati. Cairan peritoneum sel makrofag dan sel PMN diambil dengan alat haemositometer, hingga didapatkan populasi Makrofag dan PMN 10^7 sel/ml.

Uji Viabilitas Makrofag dan PMN (Anonim, 2005; Hidayat, 2002)

Uji viabilitas makrofag dan PMN dilakukan dengan melihat kemampuan makrofag dan PMN untuk hidup. Dihitung jumlah sel viabel (tidak terwarnai) dengan jumlah sel yang mati (terwarnai). Sel diwarnai dengan biru tripan 0,4% dalam larutan fisiologis. Kemudian dihitung persen viabilitas jumlah sel hidup yang diamati di bawah mikroskop perbesaran 100x.

Uji fagositosis dengan pewarnaan giemsa (Dey dan Harborne, 1991; Sinaga, 2008)

Kelompok I, suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* sebanyak 200 μ l dengan jumlah 10^9 sel/ml dan ekstrak angkak dengan konsentrasi yang berbeda yakni 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml dan 0,0001 mg/ml sebanyak 200 μ l serta ekstrak herba meniran komersial sebagai imunomodulator pembanding sebanyak 200 μ l ketiga suspensi ini dicampur dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. kemudian ditambahkan 50 μ l larutan EDTA 0,2 M lalu dihomogenkan.

Kelompok II, sebagai kontrol positif digunakan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* sebanyak 200 μ l dengan jumlah 10^9 sel/ml dan ekstrak herba meniran komersial sebagai imunomodulator pembanding ekstrak herba meniran komersial sebanyak 200 μ l, kedua suspensi ini dicampur dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. kemudian ditambahkan 50 μ l larutan EDTA 0,2 M lalu dihomogenkan.

Kelompok III, sebagai kontrol negatif suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* sebanyak 200 μ l dengan jumlah 10^9 sel/ml dan Cairan peritoneum mencit 10^7 sel/ml sebanyak 200 μ l tanpa pemberian ekstrak uji. Kedua suspensi ini dicampur dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan 50 μ l larutan EDTA 0,2 M lalu dihomogenkan.

Masing-masing perlakuan di atas dibuat preparat ulas kemudian difiksasi dengan metanol, dibiarkan selama 5 menit, kelebihan metanol dibuang. Preparat diwarnai dengan meneteskan larutan pewarnaan giemsa 10% dan didiamkan selama 45 menit kemudian dibilas dengan air mengalir dan biarkan mengering di udara. Setelah kering preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x, dihitung aktivitas fagositosis sel makrofag dan sel PMN.

Penetapan Nilai Aktivitas Fagositosis (Dey dan Harborne, 1991).

Jumlah sel makrofag dan sel PMN yang secara aktif melakukan proses fagositosis dalam 100 sel dengan banyaknya sel makrofag dan sel PMN yang dinyatakan dalam persen.

Rumus nilai fagositosis:

$$\% \text{ aktivitas Makrofag} = \frac{\text{Jumlah sel Makrofag aktif}}{\text{Jumlah total Makrofag}} \times 100\%$$

$$\% \text{ aktivitas PMN} = \frac{\text{Jumlah sel PMN aktif}}{\text{Jumlah total PMN}} \times 100\%$$

Sebelum dilakukan perhitungan aktivitas fagositosis sel makrofag dan sel PMN, terlebih dahulu dilakukan uji viabilitas untuk mengetahui kemampuan hidup dari sel makrofag dan sel PMN yang dinyatakan dalam persen dengan melihat jumlah sel hidup dan jumlah sel yang mati dengan menggunakan larutan biru tripan. Persyaratan % viabilitas tidak kurang dari 95% atau tidak lebih dari

50% kematian. Jumlah % viabilitas dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{N sel hidup}}{\text{N sel hidup} + \text{N sel mati}} \times 100\%$$

Analisis data

Data yang diperoleh diolah secara statistik untuk mengetahui pengaruh imunomodulator ekstrak beras fermentasi beberapa isolat *Monascus purpureus* terhadap aktivitas in vitro fagositosis sel makrofag dan polimorfonuklear peritonium mencit digunakan Analisa Varian satu arah (ANOVA). Dari hasil observasi berulang digunakan variabel bergantung yang digunakan untuk menguji perbedaan secara keseluruhan rata-rata terhadap uji fagositosis sel makrofag dan Polimorfonuklear yang negatif dibandingkan dengan kelompok kontrol dan pembeding (Dey dan Harborne, 1991). Dan dilanjutkan dengan uji Turkey untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol pembeding.

HASIL

Hasil Fermentasi Beras

Hasil fermentasi beras dari ketiga jenis kapang *Monascus purpureus* yakni *M.purpureus* JMBA, TST dan AS yang telah diinkubasi selama 14 hari dan disebut dengan angkak, menunjukkan karakteristik berwarna merah, kering, baunya khas dan rasa khas beras (Foto 1 dan Foto 2).

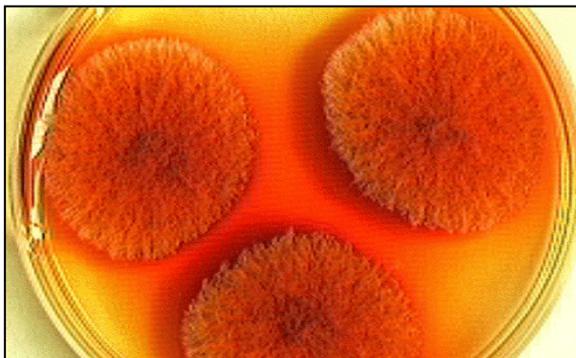


Foto 1. Isolat *Monascus purpureus* JMBA



Foto 2. Angkak JMBA

Uji Viabilitas Sel Makrofag dan Sel PMN

Uji viabilitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan daya hidup dari sel makrofag dan sel PMN yang dinyatakan dalam persen dengan melihat jumlah sel makrofag dan sel PMN yang hidup (tak terwarnai) dan yang mati (terwarnai) dengan menggunakan larutan biru tripan dan dihitung dengan alat hitung hemositometer yang terdiri dari 9 area masing-masing berukuran 1 mm². Area paling tengah terdiri dari 25 kotak kecil, dan setiap kotak kecil terdiri 16 kotak lebih kecil lagi. Dengan demikian kotak paling tengah dari 9 area itu terdiri dari 25 x 16 kotak = 400 kotak.

Sel-sel hidup (tak terwarnai) oleh larutan biru tripan disebabkan integritas dari membran yang baik. Sel-sel yang mati akan menyerap zat warna biru tripan oleh karena susunan atau integritas membran selnya telah rusak sehingga biru tripan akan masuk melalui lubang-lubang membran sel ke dalam sel (sitoplasma). Pada Gambar 1 dapat dilihat hasil penghitungan sel makrofag dan PMN peritoneum mencit. Persyaratan persen viabilitas tidak kurang dari 95% dan penghitungan sel makrofag dan sel PMN disajikan pada Tabel 1.

Pada Tabel 1. dapat dilihat jumlah makrofag yang hidup berkisar antara 1.056×10^3 - 1.328×10^3 sel/ml sedangkan jumlah makrofag yang mati berkisar antara $14,3 \times 10^3$ - 48×10^3 sel/ml. Demikian juga dengan jumlah PMN yang hidup setelah diberi pewarnaan berkisar antara $81,1 \times 10^3$ - 1.232×10^3 sel/ml dan jumlah sel PMN yang tidak terwarnai (mati) adalah $13,3 \times 10^3$ - 48×10^3 sel/ml.

Sebelum dilakukan uji aktivitas imunomodulator, terlebih dahulu diukur kepadatan jumlah sel bakteri dengan menghitung transmitan (T 25%) dari suspensi bakteri dengan menggunakan alat spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 580 nm. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya sel bakteri berlebihan pada saat pengujian aktivitas. Dan juga dilakukan uji viabilitas untuk mengetahui daya hidup dari sel makrofag dan sel PMN.

Pengujian aktivitas imunomodulator dilakukan dengan metode pewarnaan sederhana dengan

salah satu pewarna. Dan dilakukan dengan metode *in vitro* dengan teknik fagositosis sel makrofag dan sel PMN peritoneum mencit yang diinduksi dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus*. Penggunaan bakteri uji *Staphylococcus aureus* sebagai antigen, karena *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif sehingga mampu mengikat warna giemsa dengan lebih jelas, berbentuk bulat (kokus) sehingga mempermudah proses perhitungan aktivitas fagositosis di bawah mikroskop serta memiliki kemampuan membentuk sejumlah toksin dan enzim digestif.

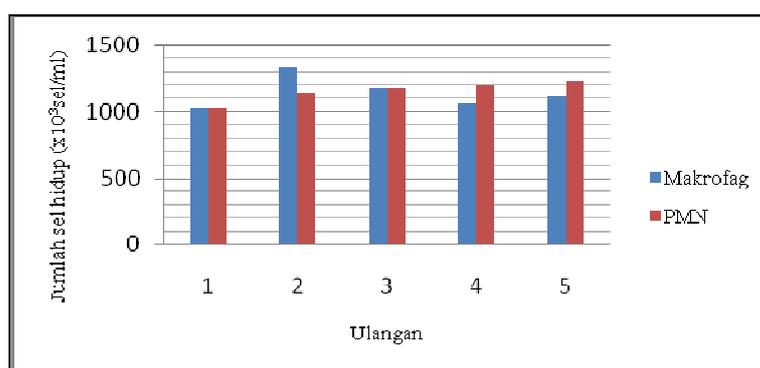
Berdasarkan hasil pengamatan preparat ulas gambaran sel darah putih yang diwarnai dengan pewarna giemsa di bawah mikroskop, yaitu mengamati makrofag dan PMN yang menempel atau sesudah memakan bakteri uji (Foto 3a dan Foto 3b). Kualitas pewarnaan giemsa ini ditentukan oleh mutu giemsa, air pengencer, lama reaksi yang dibutuhkan, kualitas pembuatan sediaan apus, kebersihan kaca sediaan, serta kecermatan dalam proses pewarnaan (Wati, 2006).

Penggunaan variasi konsentrasi ekstrak uji (Tabel 2) dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak uji yang diberikan dengan aktivitas fagositosis sel makrofag dan sel PMN yang ditimbulkan serta untuk mengetahui jenis serta pada konsentrasi berapa ekstrak uji bekerja efektif. Kelompok kontrol untuk melihat adanya perbedaan dengan kelompok uji sehingga efektifitas ekstrak uji dapat diketahui kriteria perhitungan sel makrofag dan sel PMN yang memfagositosis. Perhitungan aktivitas fagositosis sel makrofag dan sel PMN dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya.

Pada Gambar 2, dapat dilihat bahwa pemberian berbagai konsentrasi ekstrak *M. purpureus* mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak *M. purpureus* semakin tinggi aktivitas makrofag. Hal ini terlihat pada konsentrasi 1 mg/ml *M. purpureus* JMBa, AS, TST merupakan aktivitas tertinggi fagositosis makrofag yakni berturut-turut 87,67%, 78,33% dan 79%, akan tetapi isolat *M. purpureus* JMBa 1 mg/ml se-

Tabel 1. Hasil Penghitungan Sel Makrofag dan PMN Peritoneum Mencit

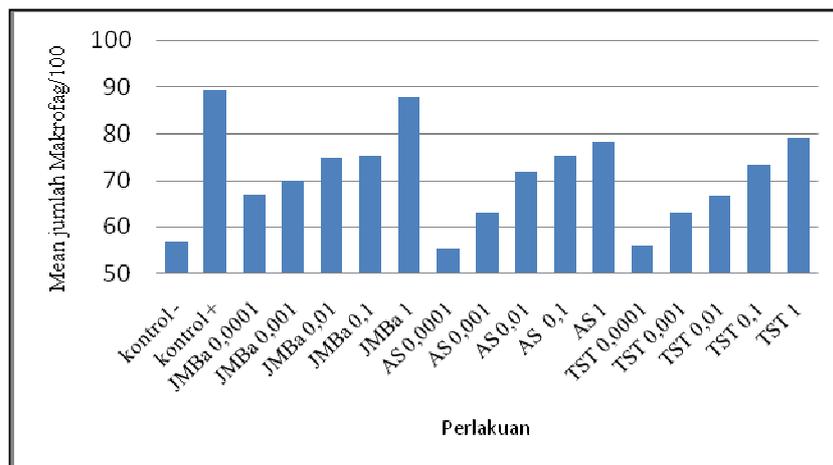
Ulangan	Jumlah Makrofag hidup (sel/ml)	Jumlah PMN hidup (sel/ml)	Jumlah makrofag mati (sel/ml)	Jumlah PMN mati (sel/ml)	% Viabilitas Makrofag	% Viabilitas PMN
1.	1024x10 ³	1024x10 ³	16x10 ³	16x10 ³	98,46%	98,46%
2.	1328x10 ³	1136x10 ³	48x10 ³	32x10 ³	96,51%	97,26%
3.	1184x10 ³	1184x10 ³	48x10 ³	32x10 ³	96,10%	97,36%
4.	1056x10 ³	1200x10 ³	48x10 ³	48x10 ³	95,65%	96,15%
5.	1120x10 ³	1232x10 ³	48x10 ³	48x10 ³	95,89%	96,25%
Rata-rata	1142,4x10 ³	1155,2x10 ³	41,6x10 ³	35,2x10 ³	96,52%	97,09%
SD	120,5x10 ³	81,1x10 ³	14,3x10 ³	13,3x10 ³	1,12	0,94

**Gambar 1.** Hasil viabilitas makrofag dan PMN**Tabel 2.** Hasil rata-rata % aktivitas Makrofag dan PMN dari 3 jenis *M.purpureus*

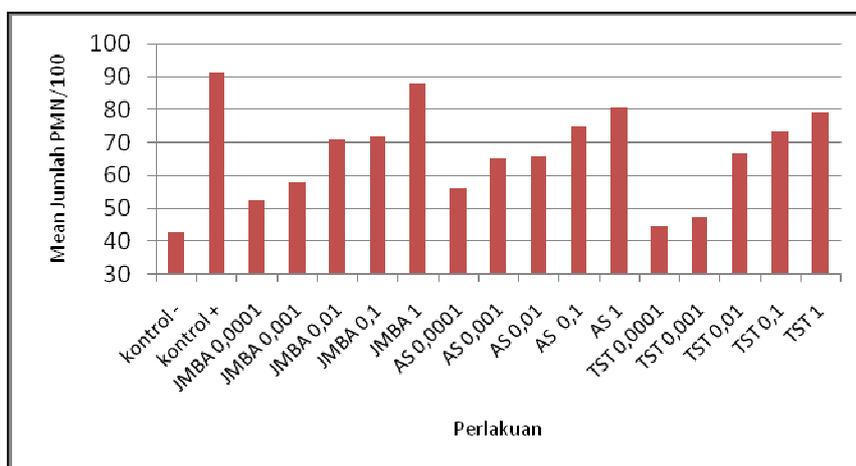
Kelompok	Konsentrasi (mg/ml)	Aktivitas makrofag aktif (%)	Aktivitas PMN aktif (%)
Kontrol –	0	56,67 ± 3,5112	42,67 ± 2,5166
Kontrol + Ekstrak uji	5	89,33 ± 0,5773	91,3 ± 0,5773
JMBa	0,0001	67 ± 2,6457	52,33 ± 4,0414
	0,001	70 ± 3,4641	57,67 ± 0,5773
	0,01	75 ± 5	71 ± 3,4641
	0,1	75,33 ± 4,6188	71,67 ± 4,7258
AS	1	87,67 ± 3,7859	88 ± 3,0550
	0,0001	55,33 ± 4,0414	56,33 ± 4,0414
	0,001	63 ± 5,1961	65,33 ± 0,5773
	0,01	72 ± 1,7320	66 ± 3,4641
TST	0,1	75,33 ± 4,1633	74,67 ± 4,7258
	1	78,33 ± 2,8867	80,67 ± 3,0550
	0,0001	56 ± 4	44,67 ± 6,4291
	0,001	63 ± 2,6457	47,33 ± 3,7859
	0,01	66,67 ± 3,0550	55,33 ± 4,6188
	0,1	73,33 ± 1,5275	70,33 ± 4,5092
	1	79 ± 1,7320	75,67 ± 4,9329

cara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kontrol positif (ekstrak herbal meniran). Pada Gambar 3, aktivitas fagositosis sel PMN dari berbagai konsentrasi ekstrak sangat berpengaruh, semakin tinggi konsentrasi ekstrak dari *M. purpureus* semakin tinggi aktivitas fagositosis-

nya. Dari ketiga ekstrak yakni ekstrak *M. purpureus* JMBa, AS dan TST, Aktivitas fagositosis sel PMN tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak JMBa 1mg/ml yakni 88% dan tidak berbeda nyata dengan kontrol positif yakni 91,3% .



Gambar 2. Persentase rata-rata fagositosis makrofag



Gambar 3. Persentase rata-rata aktivitas fagositosis polimorfonuklear (PMN)

PEMBAHASAN

Dari perhitungan aktivitas fagositosis menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak uji maka akan menyebabkan aktivitas fagositosis sel makrofag dan sel PMN peritoneum mencit semakin meningkat. Hal ini menandakan bahwa besarnya konsentrasi mempengaruhi aktivitas suatu larutan ekstrak dari larutan uji terhadap pengujian aktivitas imunomodulator yang dilakukan.

Pada kelompok kontrol negatif terdapat persentase aktivitas yang cukup tinggi yaitu sel makrofag 56,67% dan sel PMN 42,67%. Hal ini dikarenakan sel makrofag dan sel PMN memiliki fungsi yang penting pada sistem kekebalan tubuh sebagai per-

tahanan tubuh yang terdepan dalam menangkal mikroorganisme dan benda asing yang masuk ke dalam tubuh.

Data-data yang diperoleh dari pengujian aktivitas in vitro fagositosis sel makrofag dan polimorfonuklear ekstrak beras fermentasi beberapa sumber *Monascus purpureus* dianalisa dengan menggunakan program pengolahan data statistik SPSS 10 (Trihendradi, 2004). Dengan uji parametik Anova satu arah untuk melihat perbandingan antar sumber dengan konsentrasi yang sama dan dilanjutkan dengan uji Turkey untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol perbandingan.



Foto 3a. sel makrofag aktif (perbesaran 100x)

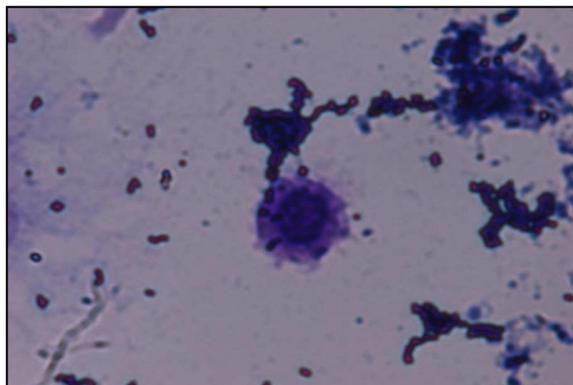


Foto 3b. PMN aktif (perbesaran 100x)

Hasil analisis menunjukkan perbandingan antar jenis angkak dengan konsentrasi yang sama dalam meningkatkan jumlah sel makrofag dan PMN yang aktif tidak berbeda nyata ($\alpha < 0,05$) dengan kontrol positif (5 mg/ml). Hal ini menandakan bahwa walau semua kapang satu jenis, tapi menunjukkan aktivitas yang berbeda. Karena pada penelitian sebelumnya, *M. purpureus* JMBa telah diteliti mempunyai kadar lovastatin yang tinggi yaitu zat yang merupakan immunomodulator. Chung Tseng *et al.* (2012) dalam penelitiannya mengatakan bahwa fermentasi beras oleh *M. purpureus* NTU 568 pada konsentrasi 10 mg mL^{-1} dapat menstimulasi proliferasi sel, produksi *nitric oxide*, fagositosis dan produksi cytokine (termasuk IL-1- β , IL-6 dan TNF- α). Selanjutnya Robins (2012) mengatakan bahwa sistem imun dan kolesterol sangat berhubungan secara integral dan penelitian dari Prof. Peter Ghazal tahun 2011 menemukan virus yang bergantung pada kolesterol untuk berkembang, hormon kekebalan dirangsang terhadap infeksi dapat menurunkan kadar kolesterol dan dengan demikian menghilangkan infeksi virus akibatnya menggunakan obat penurun kolesterol seperti lovastatin dapat meningkatkan fungsi kekebalan tubuh.

Dari hasil analisa aktivitas tersebut, maka dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak beras fermentasi *Monascus purpureus* memiliki efektifitas yang sebanding dengan kelompok kontrol positif yang mengandung herba meniran (*Phyllanthus neruri*

L.) dan zat yang diduga memiliki efek sebagai immunomodulator dalam angkak adalah lovastatin.

Immunomodulator pembanding yang digunakan dalam pengujian adalah ekstrak herba meniran komersial. Ekstrak herba meniran dapat memodulasi sistem imun lewat proliferasi dan aktivitas sel T dan sel B. Pada kelompok kontrol positif menunjukkan aktivitas fagositosis yang sangat tinggi, kemungkinan sifat immunomodulator kelompok kontrol positif ini memiliki kandungan kimia yang terdapat dalam herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.) adalah senyawa-senyawa kimia golongan lignan, antara lain filantin, bipofilantin, niranin, nirtetralin dan fitetralin. Karena meniran memiliki kandungan utama senyawa golongan flavonoid diantaranya quercetin, quercetrin, isoquercetrin, astragalin, rutin dan glikosida flavonoid serta alkaloid yaitu 4-metoksi-norsekurinin dan ent-norsekurinin, maka tanaman ini bisa menghambat over produktivitas enzim ksantin oksidase dan superoksidase. Meniran digunakan untuk mengobati berbagai penyakit diantaranya malaria, sariawan, nyeri ginjal, diare, demam, diuretik serta kencing batu (Chairul, 1990).

Kemampuan fagositosis yang dilakukan oleh sel makrofag dan sel PMN mencit adalah salah satu manifestasi sistem respon imun yang dimiliki oleh mencit untuk mengatasi agen infeksi yang masuk. Aktivitas fagositosis dipengaruhi oleh berbagai faktor fagosit diantaranya adalah ketersediaan energi untuk proses fagositosis dan faktor bakteri yang

difagosit meliputi susunan dinding sel bakteri, ada tidaknya kapsul, toksin dan sifat permukaan bakteri. Faktor lingkungan yang berpengaruh adalah suhu tubuh individu, pH darah dan cairan tubuh individu. Mekanisme pengaruh lingkungan tersebut masih memerlukan penelitian lebih lanjut, sehingga pemilihan hewan uji yang tepat berpengaruh terhadap aktivitas makrofag dan PMN peritoneum mencit setelah pemberian ekstrak uji dikarenakan adanya peningkatan sekret sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel imunokompeten, antara lain interleukin-1 β (1L-1 β). Dengan adanya sitokin yang merupakan faktor pengaktif sel makrofag dan sel PMN, maka aktivitas fagositosis makrofag dan PMN ditingkatkan. Akumulasi sel fagosit di dalam lisosom yang meningkatkan efektivitas sel fagosit untuk melisiskan bakteri yang difagosit. Akumulasi ini diduga meningkatkan fungsi biologis dari sel monosit. Selain itu peningkatan monosit dapat dipicu oleh berbagai faktor, salah satunya oleh sel T yang peka (Wati, 2006). Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa ekstrak beras fermentasi (angkak) mempunyai efek sebagai immunomodulator dan diharapkan dapat memberikan informasi tentang manfaat dan penggunaannya.

Berdasarkan kandungan kimia angkak, diduga yang memiliki efek sebagai immunomodulator adalah lovastatin. Pada penelitian ini tidak dilakukan uji penapisan. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penapisan kimia yang memiliki efektivitas immunomodulator dari angkak, terhadap fraksi dari angkak dan penelitian toksisitas terhadap mencit.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Ekstrak beras fermentasi beberapa sumber *Monascus purpureus* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag dan polimorfonuklear peritoneum mencit secara in vitro. Pada konsentrasi 1 mg/ml mempunyai nilai aktivitas yang lebih tinggi dibanding kontrol positif.

Adanya perbedaan konsentrasi mempengaruhi aktivitas fagositosis sel makrofag dan polimorfonuk-

lear semakin besar konsentrasi semakin besar pula aktivitas fagositosis sel makrofag dan polimorfonuklear peritoneum mencit secara in vitro.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penapisan kimia yang memiliki efektivitas immunomodulator dari angkak dan lebih lanjut dari fraksi angkak yang memiliki efektivitas immunomodulator baik in vitro maupun in vivo, serta uji toksisitas ekstrak angkak terhadap mencit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh kegiatan DIPA Tematik Pusat Penelitian Biologi-LIPI TA. 2009. Kami sampaikan ucapan terima kasih kepada Puslit Biologi. Tak lupa ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga kami sampaikan kepada Ibu Ernawati Kasim, Rina Andriani, Ratih dan Acun yang turut serta dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Altieri DC. 2001. Statins' benefit begin to sprout. *J. Clin. Invest.* **108**, 365-366.
- Anonim. 2004. Pelatihan Singkat Teknik Laboratorium Hewan Percobaan Bidang Biologi Dasar. *Buku Panduan dan Modul Dirja Departemen Pendidikan Nasional dan Pusat Ilmu Hayati.*
- Anonim. 1986. *Teknik Farmakodinamika dan Keamanan Obat Beberapa Uji Farmakologi*, 111-118. Staf Unit Bidang Farmakologi-Toksikologi. ITB, Bandung.
- Anonim. 2005. Respon Fagositosis Leukosit Polimorf Babi (in vitro). Terhadap *Streptococcus equisubsp Zooepidemicus*. <http://www.jvetunud.com/archives/3/Mei/2008>
- Anonim. 2008. Angkak meningkatkan jumlah trombosit. [http://www.angkak.com/artikel/diambil diposting oleh Tari west Borneo April 2008](http://www.angkak.com/artikel/diambil_diposting_oleh_Tari_west_Borneo_April_2008).
- Bratawidjaja KG. 2002. *Imunologi Dasar*, 372-390. Edisi ke-5, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Chairul. 1990. Tempuyung untuk menghadang asam urat. *Intisari. www.Indonesia. Media.com/intisari/1999/Juni/tempuyung*, htm lbk Chaced-similar pages, desember 2008.
- Tseng KC, TJ Fang, SS Chiang, Liu, CL Wu and TM Pan. 2012. Immunomodulatory activities and antioxidant properties CF of polysaccharides from *Monascus fermented products in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92(7)**, 1483-1489.
- Dennis L and JW Marks. 2006. *Red Yeast Rice and Cholesterol - A Critical Review*". *Medicine net.com* Retrieved August 19, 2006.
- Departemen Kesehatan RI. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV, 7. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Dey PM and JB Harborne. 1991. *Method in Plant in Biochemistry. Assay for Bioactivity* **6**, 196-198. Academic Press,

- New York, Boston, Sydney Toyota, Toronto.
- Erdogrull O and S Azirak. 2004.** Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). *Turkish Electronic J Biotech.* 2, 37-49.
- Hargono D. 2008.** *Sebelum Mengenai Obat Nabati dan Sistem Imunitas.* <http://www.kalbe.co.id/ulasan/maret> 2008
- Hidaya MA. 2002.** *Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Heksana Daun Eupatorium triplinerv Vahl. terhadap Kultur Sel Mieloma*, 94. FMIPA. Jurusan Kimia-Universitas Jember.
- Kresno SB. 2001.** *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, 7. Edisi ke-4, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kurnianto G. 2008.** *Mutasi missense pada gen PCSK9 dihubungkan dengan hiperkolesterolemia dan kemungkinan peningkatan respon terapi statin.* <http://penelitian.lovastatin>, artikel 2008.
- Mayer G. 2011.** *Innate (Non Spesific) Immunity* .Microbiology and Immunology on-line. University of South Carolina School of Medicine. <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm>.
- Robins C. 2012.** The Best Red Yeast Rice for Immune System. <http://www.livestrong.com/article/555152> diakses 15 Maret 2012.
- Sinaga E. 2008.** *Alpinia galanga.* [http://iptek.apsii.or.id/artikel/tanaman-Tanaman obat/unas/kencur, pdf.](http://iptek.apsii.or.id/artikel/tanaman-Tanaman%20obat/unas/kencur.pdf) Maret 2008.
- Trihendradi C. 2004.** *Memecahkan Kasus Statistik, Deskriptif; Parametrik dan non Parametrik dengan SPSS 12*, 102-105 Yogyakarta.
- Triana E dan N Nurhidayat. 2006.** Pengaruh pemberian beras yang difermentasi oleh *monascus purpureus* jmba terhadap darah tikus putih (*Rattus sp.*) hiperkolesterolemia. *Biodiversitas* 7(4), 317-321.
- Wati HV. 2006.** Uji efek immunomodulator ekstrak temu giring (*Curcuma heyneana* Val. & V.Zipp) dan temu putih (*Curcuma zedoria* (Berg) Roscoe.). *Skripsi.* Fakultas MIPA Universitas Hamka, Jakarta.