

**OPTIMALISASI TNF  $\alpha$  DAN IL-3 MENGGUNAKAN BUAH TOMAT (*Lycopersicon esculentum* Mill var. *grandifolium*) SEBAGAI UPAYA PENINGKATAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG TERHADAP INFEKSI BAKTERI**

Eny Hartadiyati Wasikin Haryanti<sup>1)</sup>, Praptining Rahayu, Maria Ulfa

<sup>1</sup> Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA IKIP PGRI Semarang  
email: enyhartadiyati\_wh@yahoo.com

**OPTIMIZATION OF TNF  $\alpha$  AND IL-3 USES TOMATOES (*Lycopersicon esculentum* Mill var. *grandifolium*) AS EFFORTS IN INCREASING MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS TO BACTERIAL INFECTION**

**ABSTRACT**

TNF  $\alpha$  and IL-3 are sitokin stimulates macrophage phagocytosis to the activity in eliminating bacteria. Karotenoid is come from natural resources, one of them is tomatoes, as known carotene and likopen have potential in increasing TNF  $\alpha$  and IL-3. Mencit balb/c in normal condition are 24 tails randomly uses thermal variations: (50<sup>0</sup>C, 100<sup>0</sup>C dan 150<sup>0</sup>C) role to sitokin TNF  $\alpha$  and IL-3 content. The result shows tomatoes preparasi in 150<sup>0</sup>C is (p<0.05) effects sitokin content of TNF  $\alpha$  and IL-3 highest.

**Key words:** TNF  $\alpha$ , IL-3, tomatoes

**ABSTRAK**

TNF  $\alpha$  dan IL-3 merupakan sitokin yang berperan untuk merangsang fagositosis makrofag dalam mengeliminasi bakteri. Karotenoid yang berasal dari sumber alami, salah satunya dalam buah tomat. Diketahui karoten dan likopen yang berpotensi meningkatkan TNF  $\alpha$  dan IL-3. Mencit balb/c keadaan normal sebanyak 24 ekor dipilih secara random digunakan untuk menyelidiki pengaruh preparasi buah tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill var. *grandifolium*) yang matang dengan variasi suhu : (50<sup>0</sup>C, 100<sup>0</sup>C dan 150<sup>0</sup>C) terhadap kadar sitokin TNF  $\alpha$  dan IL-3 dari kultur sel makrofag. Hasil penelitian menunjukkan preparasi buah tomat dengan suhu 150<sup>0</sup>C secara bermakna

( $p < 0.05$ ) menyebabkan kadar sitokin TNF  $-\alpha$  dan IL-3 yang paling tinggi .

Key words: TNF  $-\alpha$ , IL-3, buah tomat

## **PENDAHULUAN**

Tomat merupakan buah yang banyak dikonsumsi masyarakat baik dimakan langsung, campuran dalam sayur-mayur sehari-hari, maupun dipergunakan sebagai produk-produk olahan seperti jus, saus, dan pasta tomat. Tomat diketahui mengandung banyak karotenoid likopen, dan karotenoid lainnya seperti  $\beta$ -karoten dan lutein.

Banyak faktor yang mempengaruhi absorpsi dan bioavailabilitas diet karotenoid. Karotenoid, termasuk likopen ditemukan berada dalam bentuk kristalin atau terikat protein kompleks dalam bahan makanan. Tahap pertama agar dapat terabsorpsi adalah pelepasan likopen dari bentuk ikatan tersebut (Clinton ,S.K,1998 dan Parker ,R.S, 1997) . Terlepasnya likopen dari matriks makanan akibat suatu proses, keberadaan diet lipid dan isomerisasi yang disebabkan panas pada konformasi *all-trans* menjadi *cis* meningkatkan bioavailabilitas likopen (Williams , AW, et al., 1998) . Kadar likopen dalam olahan tomat bentuk pasta lebih tinggi dibanding olahan yang lain seperti saus dan tepung tomat ( Khachick et al., 2002).

Antioksidan dalam buah-buahan dan sayuran telah memperlihatkan kemampuannya memberikan efek memodulasi fungsi imun ( Shuichi Kainogawa et al., 2004). Beberapa penelitian menunjukkan pemberian jus tomat selama periode tertentu berhasil menambah kadar serum karotenoid (dengan likopen memiliki kenaikan yang paling besar) dan menstimulasi limfosit T, demikian juga meningkatkan TNF  $-\alpha$  ( Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) (Bernhard Watzl et al. 2000). Secara empiris TNF- $\alpha$  dan IL-3 ( Interleukin-3) dapat meningkatkan NO makrofag yang penting dalam mekanisme eliminasi bakteri. Peran buah tomat sebagai imunomodulator terhadap infeksi bakteri merupakan permasalahan yang menarik untuk dikaji. Imunomodulator pada infeksi bakteri pada akhirnya akan

menstimulasi respon imun dengan cara merangsang produksi antibody, aktivasi dan proliferasi sel T dan makrofag.

Bakteri dapat melawan penggabungan fagolisosom dan bermultiplikasi dalam makrofag (Owens, MD et al. , 1999). Upaya tubuh menghadapi bakteri intraseluler maupun ekstraseluler adalah melalui respon imun spesifik maupun nonspesifik. Efektor imunitas nonspesifik utama terhadap bakteri adalah sel fagosit dan NK sel. Bakteri dapat mengaktifasi NK sel atau melalui aktivasi makrofag dan sel imunitas yang lain seperti limfosit, monosit dan neutrofil. Namun aksi poten untuk membunuh mikroba dilakukan oleh serangkaian aksi sebagai berikut senyawa IL-3 dapat meningkatkan makrofag yang teaktivasi (Kauffman et al., 2002) dan NO makrofag yang distimulasi oleh TNF  $\alpha$ . Makrofag yang teraktivasi kemudian dapat membunuh mikroba menggunakan molekul pembunuh dalam fagolisosom diantaranya NO ( Nitric Oxide). NO memiliki sifat reaktif tinggi untuk melawan patogen (Abbas AK et al., 2005)

Karakter interaksi kadar karotenoid serum darah atau jaringan yang artinya memperlihatkan bioavaibilitas yang tinggi dengan kadar senyawa imunitas yang tinggi memberikan pemahaman secara komprehensif tentang potensi imunomodulator dari buah tomat .

Berdasarkan penjelasan di atas menarik untuk menganalisis teknik preparasi buah tomat dengan variasi suhu ( $50^{\circ}\text{C}$ ,  $100^{\circ}\text{C}$  dan  $150^{\circ}\text{C}$ ) sebagai upaya menghasilkan bioavailabilitas tinggi dalam tubuh terhadap kadar TNF  $\alpha$  dan IL-3 dari cairan makrofag dan mengetahui suhu berapakah yang menghasilkan kadar TNF  $\alpha$  dan IL-3 paling tinggi.

Penelitian karotenoid dalam buah tomat buah tomat tipe kentang (*Lycopersicon esculentum* Mill var. *grandifolium*) memberikan informasi tentang potensi buah tomat yang mudah dan murah serta dapat bermanfaat sebagai imunomodulator.

## MATERIAL DAN METODE

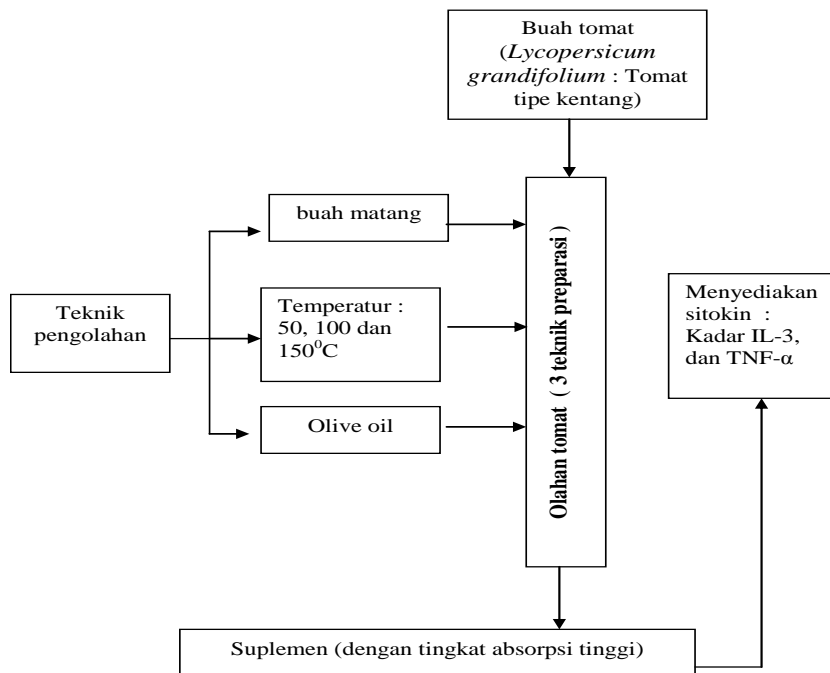
### 1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah mencit jantan Balb/c yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

Kriteria inklusi : strain Balb/c, jenis kelamin jantan, umur 8-10 minggu, berat badan 20-30 gram, sehat sebelum infeksi. Kriteria eksklusi : terdapat kelaianan anatomi, mencit mati. Besar sampel yang akan digunakan yaitu enam ekor perkelompok . Mencit dibagi 4 kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan sebanyak 24 ekor.

### 2. Metode dan Desain Penelitian

Penelitian diawali dengan preparasi buah tomat tipe kentang (*Lycopersicon esculentum* Mill var. *grandifolium*) untuk menghasilkan karotenoid dengan bioavailabilitas yang tinggi dan potensinya menstimulasi sekresi senyawa imunitas seperti TNF  $\alpha$  dan IL-3 . Upaya tersebut dilakukan melalui prosedur penelitian ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema preparasi buah tomat terhadap kadar TNF  $\alpha$  dan IL-3

Hasil preparasi buah tomat dicobakan pada 24 ekor mencit jantan Balb/ c dengan rancangan *post test control group design* .

Dua puluh empat ekor mencit jantan Balb/ c diadaptasikan dalam kandang dan diberi ransum pakan standard serta minum selama satu minggu secara ad libitum selanjuta mencit dibagi dalam empat kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor mencit yang dipilih secara acak dan dikandangan secara berkelompok, dan diberi perlakuan selama 15 hari. Kelompok mencit tersebut adalah :

- |                       |   |
|-----------------------|---|
| Kelompok P0 (Kontrol) | : kelompok kontrol, tanpa pemberian buah tomat  |
| Kelompok P1           | : kelompok pemberian preparasi -1 (pemanasan 50 <sup>0</sup> C) dosis 0,36 g/ekor/hari + 1ml olive oil  |
| Kelompok P2           | : kelompok pemberian preparasi -2 (pemanasan 100 <sup>0</sup> C) dosis 0,36 g/ekor/hari + 1ml olive oil |
| Kelompok P3           | : kelompok pemberian preparasi -3 (pemanasan 150 <sup>0</sup> C) dosis 0,36 g/ekor/hari + 1ml olive oil |

### **3. Teknik Pengumpulan Data**

Data berupa TNF  $\alpha$  dan IL-3 dari supernatan kultur sel makrofag.

#### **Isolasi makrofag**

Pada hari ke-16 , mencit diterminasi dengan cara dislokasi tulang leher, selanjutnya mengisolasi makrofag dari cairan rongga peritoneum mencit dengan metode Ding dan Lewis :

Prosedur dibawah ini dilakukan untuk mendapatkan  $5 \times 10^5$  sel/ml.

1. Mencit didekapitasi dengan dislokasi tulang leher.
2. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit perut terbuka dan selubung peritoneumnya dibersihkan dengan alcohol 70%
3. Injeksikan 10cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum
4. Peritoneum dipijat pelan untuk mendapatkan cairan yang cukup banyak
5. Cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan dalam tabung falcon 15cc

6. Cairan dalam tabung disentrifus dengan kecepatan 1200 *rpm* pada suhu 4°C selama 10 menit
7. Bila cairan terkontaminasi darah, sel dicuci dengan PBS sampai bersih
8. Buang supernatant, tambahkan 3 ml medium RPMI komplet yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10%, dan penicillin pada pellet yang didapat
9. Sel-sel dihitung dengan hemositometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisisikan sel darah merah
10. Lakukan resuspensi dengan medium komplet di dalam microplate 96 well yang di bawahnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (coverslip), setiap sumuran 200 µl (kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/ml)
11. Inkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C selama 30 menit
12. Tambahkan medium RPMI komplet 1 ml tiap sumuran
13. Inkubasi lagi selama 2 jam
14. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplet 1 ml tiap sumuran
15. Inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam

#### **Analisis Kadar TNF $\alpha$ dan IL-3**

Analisis kadar TNF  $\alpha$  dan IL-3 dilakukan menggunakan supernatan dari kultur sel makrofag. Pengukuran kadar TNF  $\alpha$  menggunakan teknik ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) for quantitative detection, dari eBioscience, USA. Pengukuran kadar IL-3 menggunakan *the quqntitqtive sandwich enzyme immunoassay technique*, dari Quantikine, R&D Systems USA.

#### **4. Analisis dan Interpretasi Data**

Data hasil penelitian yaitu : kadar TNF  $\alpha$  dan IL-3 yang terkumpul dilakukan *cleaning, coding*, dan tabulasi selanjutnya dientry ke dalam komputer, selanjutnya dilakukan analisis statistik dengan urutan sebagai berikut :

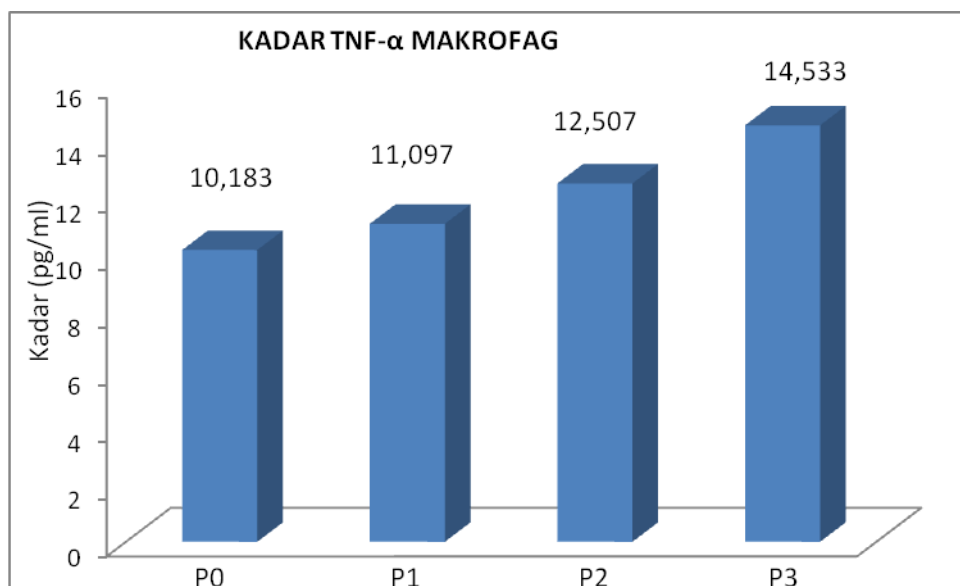
Analisis yang dilakukan secara *univariat* dengan menghitung nilai *mean* terhadap kadar TNF  $\alpha$  dan IL-3 tiap kelompok, selanjutnya data disajikan dalam bentuk grafik batang. Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, dilakukan uji normalitas.

Kadar TNF  $\alpha$  dan IL-3 yang terukur setelah perlakuan dianalisis dengan uji parametrik ANOVA, dengan tingkat kepercayaan 5 % dilanjutkan dengan UJGD (Uji Jarak Ganda Duncan). Seluruh analisis data dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas pengolahan dan penyaji data program *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) for Window Release 20.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### KADAR TNF- $\alpha$

Preparasi buah tomat dengan variasi suhu 50<sup>0</sup>C , 100<sup>0</sup>C dan 150<sup>0</sup>C menyebabkan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-3 dari kultur sel makrofag seperti yang terlihat pada Gambar 2. di bawah ini :



Gambar 2. Kadar TNF- $\alpha$  Makrofag

Keterangan :

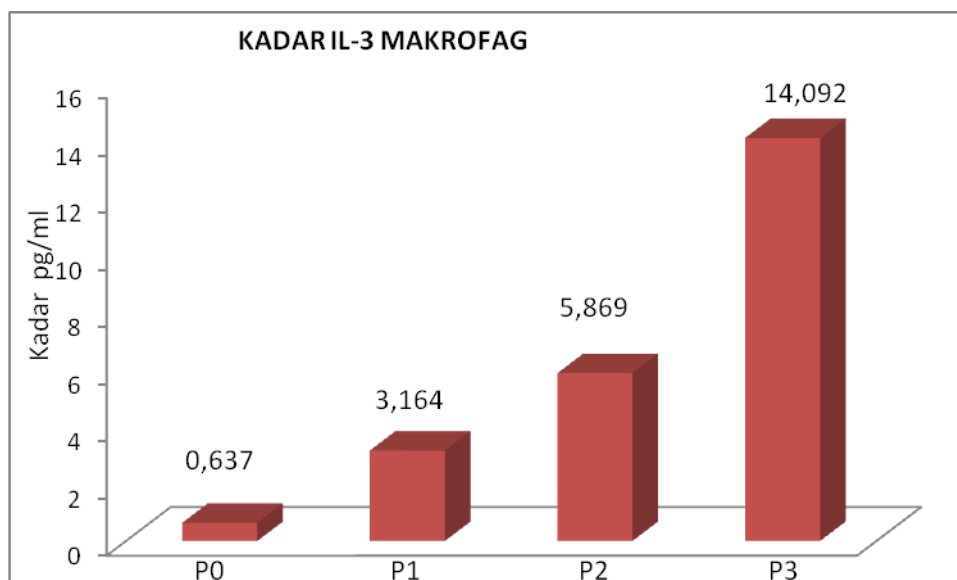
P0 : Kontrol , tanpa pemberian buah tomat

P1 : Preparasi buah tomat matang pada suhu 50 <sup>0</sup>C + olive oil 1 ml

P2 : Preparasi buah tomat matang pada suhu 100 <sup>0</sup>C + olive oil 1 ml

P3 : Preparasi buah tomat matang pada suhu 150 <sup>0</sup>C + olive oil 1 ml

Adapun kadar IL-3 terlihat pada Gambar 3. berikut ini:



Gambar 3. Kadar IL-3 Cairan Makrofag

Data hasil penelitian menunjukkan rerata kadar TNF- $\alpha$  pada P1, P2 dan P3 (semua perlakuan) lebih tinggi dibanding P0 (kontrol) dan P3 menunjukkan kadar paling tinggi. Hasil analisis data menggunakan ANOVA menunjukkan kadar TNF- $\alpha$  berbeda secara bermakna, ( $F=342,640$  ;  $sig= 0,00$ ), dan berdasarkan uji lanjut menggunakan UJGD diketahui semua perlakuan berbeda secara bermakna ( $p<0,05$ ) dengan P0 (kontrol) namun antar perlakuan tidak berbeda secara bermakna ( $p>0,05$ ).

Demikian pula kadar IL-3, P1, P2 dan P3 (semua perlakuan) lebih tinggi dibanding P0 (kontrol) dan P3 menunjukkan kadar paling tinggi. Hasil analisis data menggunakan ANOVA menunjukkan IL-3 berbeda secara bermakna, ( $F=41,860$ ;  $sig =0,00$ ), dan berdasarkan uji lanjut menggunakan UJGD diketahui P0 tidak berbeda bermakna dengan P1, P2 ( $p>0,05$ ), namun P0, P1 dan P2 menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan P3 ( $p<0,05$ ).

Hasil penelitian yang demikian ini dapat dijelaskan sebagai berikut : Pemanasan dapat menyebabkan terlepasnya bentuk kristalin likopen dan betakaroten dari struktur membran selain itu dapat menyebabkan perubahan



konformasi *trans* menjadi *cis*. Konformasi *cis* menyebabkan likopen dan betakaroten dapat diserap secara maksimal oleh intestinum, dengan demikian bioavailabilitas likopen dan betakaroten di dalam tubuh dapat maksimal. Semakin tinggi suhu pemanasan ( $150^{\circ}\text{C}$ ) akan lebih memunculkan lebih banyak likopen. Likopen diketahui sebagai fitokimia yang berfungsi sebagai antioksidan dan berpotensi sebagai imunomodulator (Hartadiyati Eny, 2009 dan Hartadiyati Eny, 2012).

Spesies oksigen reaktif yang tidak seimbang dengan keberaaan antioksidan tubuh menyebabkan stress oksidatif. Stress Oksidatif ditimbulkan secara endogen dari proses metabolik seluler normal seperti respirasi mitokondria reaksi sitokrom P450, dapat pula disebabkan tingginya laju respirasi sel fagosit seperti neutrofil dan makrofag (Stohs. SJ, 1995 dan Marks DB et al., 2000) dan lebih meningkat pada keadaan terinfeksi bakteri karena aktivitas fagositosis.

Diet likopen dan betakaroten mengalami sirkulasi terikut transport lipoprotein plasma darah beredar ke jaringan hepatic dan ekstra hepatic (Argarawal and Rao, 1998), selanjutnya karotenoid terutama likopen dapat terakumulasi dalam plasma dan jaringan sehingga meningkatkan antioksidan tubuh (Hartadiyati Eny, 2009). Aktivitas antioksidan likopen dan betakaroten dapat memproteksi kerusakan seluler termasuk sel punca *hematopoietic pluripotent* yang dapat memproduksi leukosit, dan memproteksi sel-sel darah saat di sirkulasi darah serta saat meninggalkan aliran darah dan masuk ke dalam jaringan ,termasuk makrofag.

Makrofag diketahui sebagai sel efektor dalam sistem imun nonspesifik untuk pertahanan tubuh melawan agen infeksius terutama mengeliminasi bakteri. Aktifitas fagositosis makrofag distimulasi oleh TNF- $\alpha$  yang disekresi oleh makrofag dan IL-3 yang disekresi oleh sel T helper. IL-3 dapat bertindak sebagai *Macrophage activating factor* (MAF) sehingga meningkatkan makrofag yang teraktivasi (Kauffman SHE, 2002).

Makrofag yang teraktivasi dapat meningkatkan granula lisosom, lebih banyak mitokondria dan kapasitas yang lebih besar untuk memfagosit partikel yang tersaji . Penggabungan vakuola fagositik (*fagosoma*) dengan lisosom

menghasilkan fagolisosom, tempat dimana mekanisme eliminasi bakteri dikonsentrasikan. Makrofag yang teraktivasi membunuh bakteri yang difagosit dengan memproduksi molekul pembunuh agen infeksius mikroba atau zat asing lain dalam fagolisosom molekul tersebut diantaranya ROI (*reactive oxygen intermediate*) yang merupakan agen oksidasi tinggi penghancur mikroba. Selain ROI, makrofag juga memproduksi *Nitric oxide* (NO) melalui aktivasi enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Abbas AK et al., 2005). Ekspresi iNOS dipicu oleh sitokin inflamasi seperti TNF $\alpha$ . NO adalah radikal peroksi nitrit reaktif tinggi yang dapat membunuh mikroba yang telah ditelan.

Tanpa pemberian perlakuan buah tomat maka terjadi rendahnya sekresi IL-3 oleh sel T helper, hal ini berakibat rendahnya makrofag yang teraktivasi sehingga sekresi TNF- $\alpha$  juga rendah secara bermakna pada kelompok P0 (kontrol). Semakin tinggi suhu pada preparasi buah tomat semakin menunjukkan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-3 semakin tinggi. TNF- $\alpha$  yang disekresi makrofag meningkat diakibatkan oleh interaksi langsung dengan agen penginvansi seperti mikroorganisme bakteri, dapat juga diaktifkan oleh produk limfosit (limfokin) seperti IL-3 yang dirangsang oleh senyawa aktif likopen. Hasil penelitian yang sama menunjukkan likopen meningkatkan TNF - $\alpha$  demikian juga menstimulasi limfosit T. (Bernhard Watzl et al. 2000). Kadar TNF- $\alpha$  dan IL-3 paling tinggi secara bermakna pada perlakuan P3 ( $p < 0,05$ ), walaupun tidak bermakna pada TNF- $\alpha$  ( $p > 0,05$ ).

### **KESIMPULAN**

Teknik preparasi buah tomat dengan variasi suhu (50<sup>0</sup>C, 100<sup>0</sup>C dan 150<sup>0</sup>C) berpengaruh signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap kadar TNF - $\alpha$  dan IL-3 makrofag dan memperlihatkan pemanasan buah tomat matang pada suhu 150<sup>0</sup>C menghasilkan kadar TNF - $\alpha$  dan IL-3 paling tinggi.

### **DAFTAR PUSTAKA**

Abbas AK, Lichtman. 2005. *Celluler And Molecul Immunology 5 ed.* Phyladelphia Elseveral Inc.

- Argawal S, and Rao AV. 1998. Tomato and low density lipoprotein oxidation : a human dietary intervention study. *Lipids* 33 : 981-984.
- Bernyhard Watzl, Achim Bub, Mark Blockhaus, Birgit Maria Herbert, Petra Maria Luhrmann, Monika Neuhauser-Berthold and Gerhard Rechkemmer. 2000. Prolonged Tomato Juice Consumption Has No Effect on Cell-Mediated Immunity of Well-Nourished Elderly Men and Women, *J. Nutr.* 130: 1719–1723.
- Clinton ,SK. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.* 1998 ; 56 : 35-51.
- Hartadiati Eny .WH. 2009. Kajian Potensi Antioksidan Dan Sifat Hiperkolesterolemi Fraksi Lipid Likopen dari Isolasi Tomat Lokal. Hibah Bersaing DIKTI Th. Ke-3.
- Hartadiati Eny .WH. 2012. Pengaruh Pemberian Buah Tomat Sebagai Pakan Tambahan Terhadap Jumlah Leukosit Ikan Lele Dumbo. Hasil Penelitian IKIP PGRI Semarang.
- Khachik F, Beecher GR, Smith JC Jr. 1995. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolite in chemoprevention of cancer. *J. Cell Biochem. Suppl.* 22 : 234-44.
- Marks DB, AD Marks and C.M. Smith. 2000. Metabolisme Oksigen dan Toksisitas Oksigen. *Biokimia kedokteran dasar sebuah pendekatan klinis.* EGC, Jakarta. Hal. 518-530.
- Owens MD, Warren DA. *Salmonella infection* [homepage on Internet].c1999 [update 2008 Jul 17; cited 2009 Jan 22]. Availabel from: <http://emedicine.medscape.com/article/785774-overview>.
- Parker ,RS. Bioavailability of carotenoids. *Eur. J. Clin. Nutr.* (Suppl.1) 1997 ; 51 : S84-S90.
- Shuichi Kainogawa and Masanobu Nanno<sup>2</sup>. Modulation of Immune Functions by Foods Complementary and Alternative Medicine, Vol. 1, *eCAM* 2004;1(3)241–250
- Stohs SJ. 1995. The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol* 4(3-4) : 205-28.
- Williams AW, Bioleau TWM, and Erdman JW Jr. Factors influencing the uptake and absorption of carotenoid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998 ; 218 : 104-108.