



AKTIVITAS REACTIVE OXYGEN SPECIES MAKROFAG AKIBAT STIMULASI GEL LIDAH BUAYA PADA INFEKSI *Salmonella typhimurium*

R. Susanti[✉], A Yuniastuti, RS Iswari

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima 25 Januari 2012
Disetujui 1 Maret 2012
Dipublikasikan April 2012

Keywords:
Aloe vera
ROS
Salmonella typhimurium

Abstrak

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan salah satu *lethal chemical* yang dapat membunuh dan mengeliminasi bakteri pada sel fagosit. Lidah Buaya (*Aloe vera*) banyak dipakai sebagai pengobatan tradisional, tetapi belum ada bukti ilmiah sampai tingkat seluler apalagi subseluler dalam hal efek imunostimulan pada penyakit infeksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas imunostimulan dari gel lidah buaya yang ditunjukkan oleh aktivitas ROS makrofag secara *in vivo* terhadap infeksi bakteri patogen *Salmonella typhimurium*. Sebanyak 24 ekor mencit BABL/c betina umur 8-10 minggu berat 20-30 gram dikelompokkan secara acak menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok enam ekor. Kelompok kontrol tidak diberi gel *Aloe vera*, sementara kelompok P1, P2, dan P3 berturut-turut diberi gel *Aloe vera* 0,5 ml/ekor/hari; 1,0 ml/ekor/hari, dan 1,5 ml/ekor/hari. Pemberian gel *Aloe vera* dilakukan selama sembilan hari. Pada hari ke-6, mencit diinfeksi bakteri patogen *Salmonella typhimurium* intraperitoneal 10^5 CFU. Selanjutnya pada hari ke-10 mencit didislokasi dan dibedah, diambil makrofag dari peritoneum untuk dianalisis produksi ROS-nya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian gel *Aloe vera* berpengaruh signifikan terhadap peningkatan produksi ROS makrofag mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Terdapat perbedaan secara signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, P2, dan P3, tetapi tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok P1, P2, dan P3. Pemberian gel *Aloe vera* dosis 0,5 ml/ekor/hari sudah mampu meningkatkan produksi ROS makrofag.

Abstract

Reactive Oxygen Species (ROS) is one of *lethal chemicals* that can kill and eliminate bacteria in phagocytic cells. *Aloe vera* is widely used as traditional medicine, but there is no scientific evidence to prove the effect of immunostimulatory of the *Aloe vera* gel on infectious disease in the cellular or subcellular level. This research aims to determine the immunostimulatory activity of *Aloe vera* gel showed by ROS macrophage activity *in vivo* on the infection of bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. This research used 24 female mice BABL/c age 8-10 weeks weight 20-30 Gram. They were grouped randomly in four groups consisting of six mice each. The mice in the control group were not given the *Aloe vera* gel, while group P1 was given the gel of 0,5ml/mice/day, group P2 was 1,0ml/mice/day, and group P3 was 1,5ml/mice/day. The gel was given in nine days, and in 6th day the mice were infected by bacterial pathogen *Salmonella typhimurium* then in 10th day the mice were dissected to take their macrophage from peritoneum for being analyzed its ROS production. The result showed that there was a significant difference between control group and P1, P2, and P3 group, but there is no significant difference between P1, P2, and P3 group. In conclusion, the dose of 0,5 ml/mice/day was able to increase ROS macrophage production.

Pendahuluan

Demam tifoid merupakan penyakit sistemik akut yang disebabkan oleh *Salmonella typhimurium*. Di dunia, insidensi demam tifoid diperkirakan mencapai 16 juta kasus setiap tahunnya. Lebih dari 600.000 orang meninggal setiap tahun karena penyakit ini. Di Indonesia, demam tifoid atau lebih dikenal sebagai penyakit tifus merupakan penyakit endemik dan menjadi masalah kesehatan yang serius. Insidensi rata-rata mencapai 650 kasus per 100.000 penduduk di Indonesia, dengan mortalitas rata-rata bervariasi dari 3,1-10,4% (Gassem 2001). Demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhimurium* ini banyak terjadi pada musim penghujan terutama di daerah dengan tingkat sanitasi rendah dan daerah banjir.

Salmonella merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, termasuk famili Enterobacteriaceae, terdiri dari 2300 serovar. *Salmonella* memiliki antigen Vi, suatu polimer polisakarida bersifat asam yang terdapat pada permukaan membrannya. *Salmonella* bersifat motil dan patogenik (Hawley 2003). *Salmonella typhimurium* merupakan mikroorganisme fakultatif intraseluler yang dapat hidup bahkan berkembang biak dalam makrofag, tahan terhadap enzim-enzim di lisosom, mempunyai kemampuan untuk mencegah dan menghambat fusi fagolisosom sehingga sulit untuk dibunuh (Kresno 2001; Abbas & Lichmant 2003). Salah satu cara untuk membunuh kuman ini adalah dengan memacu fungsi makrofag untuk menghancurkan dan mengeliminasi bakteri tersebut menggunakan imunostimulan. Imunostimulan akan memacu fungsi makrofag untuk *killing* melalui *respiratory burst*. Makrofag yang teraktivasi akan melepaskan berbagai metabolit seperti *reactive oxygen species* (ROS). Makrofag yang teraktivasi dikarakteristikan dengan peningkatan ROS. Substansi ini merupakan mediator kunci inflamasi, mikrobisidal dan aktivasi tumorisidal dari makrofag. ROS berperan penting dalam *killing* serta merupakan salah satu *lethal chemical* yang dapat membunuh dan mengeliminasi bakteri.

Salah satu tanaman di Indonesia yang dapat berperan sebagai imunostimulan adalah *Aloe vera* atau biasa dikenal sebagai Tanaman Lidah Buaya. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa *A. vera* memiliki berbagai efek fisiologis terhadap tubuh, yaitu antiinflamasi, antioksidan, antikanker, antidiabetes, dan mengaktivasi makrofag (Grover *et al.* 2002; Krishnan 2006; Xiao *et*

al. 2007; Xu *et al.* 2008). Pemberian *A. vera* secara umum menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis dan proliferasi sistem retikuloendotelial (Im *et al.* 2005). *Aloe vera* juga terbukti mampu menstimulasi imunitas seluler maupun imunitas humoral serta menstimulasi proliferasi stem sel hematopoietik, terutama sel *granulocyte macrophage colony-forming*, dan sel *forming myeloid* dan *erythroid colonies* (Im *et al.* 2005; Boudreau & Beland 2006). Pengaruh imunostimulasi dari *A. vera* tergantung pada aktivasi sel imun alami/*innate* (makrofag, neutrofil, limfosit, dan sel NK), sintesis dan pelepasan sitokin (TNF- α , IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6 dan IL-8), pembentukan respon imun seluler, pembentukan ROS, dan induksi pembentukan *nitric oxide* (NO) (Leung *et al.* 2004; Pugh *et al.* 2001; Im *et al.* 2005; Boudreau & Beland 2006).

Kandungan bahan aktif pada *A. vera* telah diteliti mengandung *anthraquinone* (aloe-emodin dan aloin A/barbalin) (ElSohly *et al.* 2004), *cinnamoyl*, *p-coumaroyl*, *feruloyl*, *caffeoyl aloesin*, *aloemannan*, *elgonica dimer A*, *bisbenzopyran* (Saleem *et al.* 2001), *acemannan* dan *verectin* (Yagi & Takeo 2003). Identifikasi kandungan bahan aktif pada *A. vera* menggunakan *high-performance liquid chromatografi* (HPLC) menunjukkan adanya *anthrone*, *chromone*, *aloe verasin* dan *hydroxyaloin*. Glikoprotein *alocetin* dilaporkan sebagai antitumor dan antiulcer. Glukomanan dan acemannan beraktivitas sebagai penyembuhan luka, mengaktivasi makrofag, antineoplastik dan antiviral. Polisakarida dan flavonoid pada *A. vera* beraktivitas sebagai antioksidan (Hu *et al.* 2003). Esteban *et al.* (2000) mengidentifikasi adanya peroksidase pada *A. vera* yang akan bereaksi dengan H₂O₂ pada permukaan kulit, sehingga menghambat pembentukan radikal bebas.

Berbagai manfaat kesehatan dari polisakarida dalam *A. vera* antara lain adalah ektivitasnya dalam penyembuhan luka, antifungal, efek hipoglikemik atau antidiabetik, antiinflamasi, antikanker, imunomodulator dan gastroprotektif (Hamman 2008). Ekstrak gel *A. vera* merupakan antioksidan natural yang berpotensi menurunkan oksidasi lipid dan stres oksidatif (Saritha *et al.* 2010). Ekstrak *A. vera* banyak digunakan sebagai produk komersial yang diberikan secara topikal. *Aloe vera* mengandung *anthraquinon*, yang menstimulasi pembentukan ROS jika terpapar ultraviolet A dan ultraviolet B (Xia *et al.* 2011). Hal ini berdampak pada penggunaan produk *A. vera* pada manusia akan meningkatkan sensitivitas terhadap ultraviolet

(Xia *et al.* 2007).

Hasil penelitian Mohamed (2011) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak gel *A. vera* secara signifikan mampu meningkatkan *nitric oxide* (NO) serum dan kapasitas total antioksidan tikus diabetes yang diinduksi aloxan. Lebih lanjut dijelaskan bahwa antioksidan natural dalam *A. vera* (phenol, flavonoid, vitamin C, dan E) bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidatif tersebut. *Aloe vera* mampu menurunkan kerusakan peroksidatif melalui penurunan level monokine (TNF- α , IL-1 and IL-6) dan meningkatkan level superoxide dismutase (SOD). Keberadaan SOD merupakan stimulasi *A. vera* pada makrofag (Rishi *et al.* 2008).

Polisakarida dari tanaman menunjukkan sejumlah aktivitas terapeutik, antara lain melalui mekanisme modulasi sistem imun alami, terutama fungsi makrofag. Efek utama polisakarida botani (tanaman tingkat tinggi, jamur, lumut, dan alga) adalah meningkatkan dan atau mengaktifasi respon imun makrofag, imunomodulasi, antitumor, penyembuhan luka dan efek terapeutik lainnya. Polisakarida dari tumbuhan dan mikroba akan berikatan dengan reseptor permukaan dan menginduksi respon imunomodulator makrofag. Hal ini menunjukkan evolusi yang konservatif dari struktur polisakarida ini (Schepetkin & Quinn 2006)

Secara *in vitro* telah dibuktikan bahwa *A. vera* berperan sebagai imunostimulan yaitu dengan memacu dan meningkatkan aktivitas makrofag dan monosit dan menstimulasi sel T. Penelitian *in vivo* ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunostimulan dari gel lidah buaya (*Aloe vera*) yang ditunjukkan oleh aktivitas ROS makrofag secara *in vivo* terhadap infeksi bakteri patogen *Salmonella typhimurium*.

Reactive oxygen species (ROS) adalah komponen esensial pada respon imun *innate* untuk melawan bakteri intraseluler. Sel fagosit profesional membentuk ROS terutama melalui mesin NADPH oksidase fagosom. Meskipun demikian, mitokondria ROS (mROS) juga berkontribusi pada aktivitas bakterisidal makrofag melalui *Toll-like* reseptor (TLR1, TLR2 dan TLR4) (West *et al.* 2011). ROS yang dihasilkan pada metabolisme juga berimplikasi pada proses kanker, penyakit kardiovaskular dan penuaan. Progenitor CNS (*central nervous system*) dan hematopoietik stem sel mengandung lebih sedikit ROS dibanding sel dewasanya. *Cancer stem cell* (CSC) terbukti mengandung lebih sedikit ROS dibandingkan *non-tumorigenic progeny* (Diehn *et al.* 2009).

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi

bahan rujukan, informasi dan landasan bagi pengembangan penelitian berkelanjutan, terutama penelitian klinis *A. vera* sebagai imunostimulan terhadap sistem imun tubuh dalam mengeliminasi patogen intraseluler terutama *S. typhimurium*. Penelitian ini merupakan penelitian dasar, sehingga luaran yang diharapkan penelitian ini adalah dapat diketahui pengaruh penggunaan gel lidah buaya (*A. vera*) sebagai imunomodulator terhadap aktivitas ROS makrofag pada mencit yang diinfeksi *S. typhimurium*, yaitu bakteri penyebab penyakit tifus (demam tifoid).

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group Design*, menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian berbagai dosis gel *A. vera* dengan keluaran (*outcome*) produksi *reactive oxygen species* (ROS). Produksi ROS makrofag diperiksa dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay*. Dengan adanya anion *superoxide* (O_2^-) pada kultur makrofag yang diinduksi PMA (*Phorbol 12-Miristat 13-Acetate*), akan menyebabkan NBT tereduksi membentuk presipitat *formazan* yang hasilnya dibaca di bawah mikroskop.

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang dan PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penentuan dosis *S. typhimurium* untuk menginfeksi mencit dilakukan selama 14 hari untuk menentukan LD_{50} *S. typhimurium* yang digunakan adalah strain *Salmonella* virulen (*Phage type 510*) dengan dosis LD_{50} 10^6 . Dosis yang digunakan untuk pemeriksanaan imunitas seluler adalah minimal 10^5 . Kuman *S. typhimurium* diperoleh dari RS Telogorejo Semarang.

Sebanyak 24 ekor mencit betina strain BALB/c berumur 8-10 minggu dengan berat 20-30 gram (PAU Pangan dan Gizi UGM Yogyakarta) diadaptasikan selama 7 hari di laboratorium dengan dikandangkan secara memadai dan diberi pakan standar serta minum secara *ad libitum*. Pemilihan strain BALB/c karena mencit ini pada umur 8-12 minggu dilaporkan mampu memberikan respon imunitas seluler apabila diinokulasikan *S. typhimurium* hidup. Mencit BALB/c juga *susceptible*/peka terhadap infeksi *S. typhimurium*.

Mencit selanjutnya dibagi secara acak menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok enam ekor. Kelompok kontrol (K), mencit hanya mendapat pakan standar selama sembilan hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan ROS makrofag. Kelompok perlakuan 1 (P1), mencit mendapat pakan standar dan diberi jus *A. vera* dengan dosis 0,5 ml/ekor per oral setiap hari selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan ROS makrofag. Kelompok perlakuan 2 (P2), mencit mendapat pakan standar dan diberi jus *A. vera* dengan dosis 1 ml/ekor per oral setiap hari selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan ROS makrofag. Kelompok perlakuan 3 (P3), mencit mendapat pakan standar dan diberi jus *A. vera* dengan dosis 1,5 ml/ekor per oral setiap hari selama 9 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-10 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan ROS makrofag.

Gel *A. vera* yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dari daging daun yang dihaluskan. Daun *A. vera* dicuci bersih dan dibuang lapisan luar yang berwarna hijau kekuningan (*latex leaf lining*). Bagian daging (gel) daun diambil kemudian diblender (tanpa penambahan air) sesuai kebutuhan, menjadi gel.

Isolasi makrofag mencit. Sampel yang diambil dari mencit jantan strain Balb/c berupa *Peritoneal Exudate Cell* (PEC). Mencit dimatikan dengan dislokasi *cervix*. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan selubung peritoniumnya dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian diinjeksikan 100 cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritonium. Peritonium dipijat sambil ditepuk-tepuk pelan untuk mendapatkan makrofag. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan dalam tabung falcon 15 cc. Cairan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, sel dicuci dengan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) sampai bersih.

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10%, ditambah penisilin dan streptomycin pada pellet yang didapat. Sel-sel dihitung dengan hemositometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisis sel darah merah,

kemudian diresuspensikan lagi dengan medium komplit RPMI sehingga didapat susupensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Setelah itu sel dikultur dalam medium komplit di dalam *mikroplate 24 well* yang bawahnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (*coverslip*), setiap sumuran 200 μ l (kepadatan 5×10^5 sel/ml). Kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37 °C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml tiap sumuran dan diinkubasi lagi selama 2 jam. Setelah itu sel dicuci RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplit 1 ml tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

Pemeriksaan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Pada prinsipnya, makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresi anion *superoxide* (O₂⁻) yang akan mengoksidasi NBT menjadi presipitat formazan (tidak larut) yang tampak berwarna biru dengan pewarna *Neutral Red* jika dilihat dengan mikroskop cahaya. Terbentuknya presipitat yang berwarna biru tersebut dihitung persentasenya pada tiap sel makrofag sebanyak 50 sel kemudian ditentukan derajatnya. Cara pemeriksaannya adalah setelah diisolasi makrofagnya, kemudian hitung sel dengan reduksi NBT (biru) dihitung persentase dan derajatnya. Derajat presipitat didasarkan pada persentase terbentuknya presipitat, dengan kriteria sebagai berikut: Derajat 1: presipitat < 25%, Derajat 2: presipitat 25-50%, Derajat 3: presipitat 50-75%, Derajat 4: presipitat >75%. Masing-masing sediaan dibaca pada 50 sel makrofag kemudian dibuat rata-ratanya.

Data penghitungan produksi ROI makrofag merupakan data dalam skala ordinal, sehingga untuk uji hipotesis menggunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil uji *Mann Whitney U*. Analisis statistik dibantu dengan program SPSS 12 for Windows (Santoso 2002). Nilai signifikansi dalam penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki $p < 0,05$.

Hasil dan Pembahasan

Pemberian gel *A. vera* 0,5 ml/ekor/hari, 1,0 ml/ekor/hari dan 1,5 ml/ekor/hari yang dilakukan selama 14 hari pada mencit, selanjutnya diukur produksi ROS makrofag. Produksi ROS makrofag diperiksa dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay*. Dengan adanya anion superoksida/O₂⁻ pada kultur makrofag yang diinduksi PMA, akan menyebabkan NBT tereduksi membentuk

presipitat formazon. Hasil analisis produksi ROS makrofag disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 terlihat bahwa rerata produksi ROS makrofag pada kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Rerata produksi ROI makrofag paling tinggi terdapat pada kelompok P3 yaitu sebesar $2,25 \pm 0,08$, sedangkan rerata produksi ROS makrofag terendah terdapat pada kelompok kontrol, yaitu $1,53 \pm 0,17$.

Hasil uji *Kruskal Wallis* ($p=0,002$) menunjukkan bahwa pemberian gel *A. vera* mempengaruhi peningkatan produksi ROS makrofag. Rerata kelompok perlakuan lebih tinggi dari rerata kelompok kontrol ($1,53 \pm 0,17$). Kelompok P3 mempunyai rerata produksi ROS tertinggi yaitu $2,25 \pm 0,08$ diikuti oleh kelompok P2 ($2,13 \pm 0,15$), dan P1 ($2,17 \pm 0,12$).

Selanjutnya, dengan menggunakan uji beda terkecil *Mann Whitney U* (Tabel 2) terlihat bahwa semua produksi ROS makrofag pada kelompok perlakuan (kelompok P1; $p=0,003$), kelompok P2 ($p=0,004$), dan kelompok P3 ($p=0,003$) berbeda nyata dengan kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang nyata produksi ROS mencit yang mendapat gel *A. vera* dibandingkan dengan mencit yang tidak diberi gel *A. vera* tersebut, tetapi antar perlakuan dosis yang berbeda tidak ada perbedaan yang nyata. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat dikatakan bahwa pemberian dosis gel *A. vera* terendah (0,5 ml/hari) sudah mampu meningkatkan produksi ROS.

Kelompok kontrol, mencit BALB/c tetap memproduksi ROS meski dalam jumlah yang relatif rendah. Hal ini dikarenakan *Salmonella* masuk ke tubuh *hospes* (yaitu mencit), sehingga respon imun yang pertama kali bekerja adalah respon imun alami (*innate immunity*), dimana yang berperan dalam fase ini adalah sel-sel fagosit dan sel *natural killer* (NK). Antigen bakteri akan mengaktifasi sel NK secara langsung atau melalui stimulasi oleh IL-12 yang diproduksi makrofag. Sel NK juga akan memproduksi IFN γ yang akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan degradasi bakteri yang difagosit (Abbas & Lichmant 2003).

Salmonella typhimurium merupakan bakteri gram negatif yang mempunyai faktor virulensi utama berupa lipopolisakarida (LPS) yang dapat menstimulasi respon imun pada inang (Abbas & Lichmant 2003). Infeksi *Salmonella* menghambat proliferasi sel T dan produksi sitokin terutama IFN γ juga terhambat (Adrianus *et al.* 2005). Hasil penelitian McScorley *et al.* (2002) menunjukkan bahwa

respon sel T pada infeksi *Salmonella* patogenik terlokalisasi pada jaringan limfoid yang berperan pada infeksi awal infeksi, yaitu pada saluran pencernaan (*Payer's patches*) dan tidak efisien pada jaringan lain yang berespon pada infeksi akhir. Meskipun respon utama akibat infeksi *Salmonella* diperantarai sel T, namun hasil penelitian menunjukkan bahwa koordinasi antara imunitas humoral dan imunitas seluler berperan dalam menginduksi apoptosis sel makrofag yang terinfeksi *Salmonella*. Hal ini penting sebagai perlindungan untuk sel, jika eliminasi mikroorganisme ini gagal dilakukan (Eguchi & Kikuchi 2010).

Makrofag mampu menghancurkan bakteri yang terfagosit dengan membentuk fagolisosom. Bersamaan dengan itu, adanya ikatan antara mikroba dengan reseptor fagosit, maka reseptor akan mengirim sinyal yang mengaktifasi beberapa enzim dalam fagolisosom yang penting untuk terjadinya *respiratory burst* (Kaufmann 2001). *Respiratory burst* ini antara lain terdiri dari *reactive oxygen intermediate* (ROI) dan *reactive nitrogen intermediate* (RNI) yang bersifat toksik bagi mikroba. Akan tetapi *Salmonella* mampu bertahan hidup dalam makrofag, sehingga makrofag perlu selalu diaktifasi untuk dapat membunuh bakteri yang masih berada di dalam fagosom. Untuk melawan bakteri intraseluler yang mampu bertahan di dalam sel makrofag, diperlukan imunostimulan untuk meningkatkan kemampuan makrofag dalam mengeliminasi bakteri tersebut.

Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing lainnya. Makrofag diproduksi di sumsum tulang belakang dari sel induk mieloid yang mengalami proliferasi dan dilepaskan ke dalam darah sesudah atau satu periode melalui fase monoblas-fase promonosit-fase monosit. Monosit yang telah meninggalkan sirkulasi darah akan mengalami perubahan-perubahan untuk kemudian menetap di jaringan sebagai makrofag (Abbas & Lichmant 2003).

Fagosit, diawali oleh neutrofil dan makrofag yang menyerang dan menghancurkan mikroba tersebut. Tetapi peran fagosit dalam respon imun alami terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom fagosit. Sehingga respon imun spesifik akan teraktifasi oleh antigen *Salmonella*. Pada fase ini limfosit T akan mengaktifasi makrofag, sel NK, dan sel sitolitik untuk menghancurkan bakteri. Infeksi *Salmonella* tidak hanya mempengaruhi sel-sel

sistem imun natural selama infeksi awal, tetapi juga sel limfosit T. Jumlah sel CD4 dalam sirkulasi darah menentukan kualitas aktivitas sistem imun (Shirwan *et al.* 2003). CD8 adalah glikoprotein transmembran yang berperan sebagai ko-reseptor untuk *T cell receptor* (TCR). Seperti TCR, CD8 berikatan dengan *major histocompatibility complex* (MHC) khususnya MHC kelas I. CD8 terutama diekspresikan pada permukaan sel T sitotoksik, namun juga ditemukan pada sel NK (Vecchione *et al.* 2002).

Respon imun seluler (*cell mediated immunity*) memegang peranan yang sangat penting dalam mengeliminasi bakteri intraseluler seperti *S. typhimurium* melalui mekanisme fagositosis oleh makrofag dan lisis terhadap sel yang terinfeksi oleh sel T CD8⁺ dan sel NK (Baratawidjaja 2001; Gasse 2001). Bakteri yang telah difagosit akan menstimulasi makrofag untuk memproduksi IL-12 yang akan mengaktifkan sel NK. Sel NK kemudian akan mensekresikan IFN- γ yang akan mengaktifkan makrofag sehingga makrofag teraktivasi akan mensekresi senyawa-senyawa oksigen reaktif yang bersifat toksik bagi mikroba, salah satunya adalah *superoxide* (Abbas & Lichtman 2003).

Sel fagosit harus mampu membedakan antara kontak langsung dengan mikroba atau mendeteksi *shed* komponen mikroba yang letaknya berjauhan dari sel. Dektin-1 adalah reseptor pengenalan pada sel fagosit (makrofag, sel dendrit, dan neutrofil) yang mampu mendeteksi β -glucans pada dinding sel fungi dan menstimulasi secara langsung aktivitas antimikroba seluler, yaitu fagositosis dan produksi ROS. "Phagocytic synapse" merupakan model mekanisme dimana reseptor sel fagosit mampu membedakan kontak langsung atau mendeteksi mikroba yang terletak jauh. Sel fagosit hanya akan menginisiasi respon antimikroba jika diperlukan saja (Goodridge *et al.* 2011).

Selama infeksi *Salmonella*, mikroorganisme akan mengalami internalisasi dalam makrofag. Di dalam makrofag, bakteri akan masuk dalam fagolisosom dan dimatikan oleh radikal oksigen dan nitrogen. Radikal oksigen merupakan derivat *superoxide* yang dibentuk oleh *phagocyte oxidase*, sedangkan radikal nitrogen adalah sintesis NO oleh enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Vazquez-Torres & Fang 2001). Namun, pembunuhan bakteri ini dalam makrofag sepenuhnya tidak mampu mengatasi infeksi, karena kemampuan *Salmonella* mempengaruhi aktivitas enzim *phagocyte oxidase* dan iNOS (Vazquez-Torres & Fang 2001; Chakravorty *et al.* 2002). Beberapa

enzim yang dihasilkan *Salmonella* berkontribusi terhadap resistensi pembunuhan oleh radikal oksigen maupun nitrogen. Hasil penelitian Mills *et al.* (2005) menunjukkan bahwa *S. typhimurium* mempunyai flavorubredoxin yang terlibat pada resistensi bakteri terhadap NO.

ROS dan radikal bebas menjadi perhatian selama beberapa dekade terakhir. ROS termasuk radikal bebas, termasuk bentuk oksigen yang telah diaktivasi seperti anion radikal superoxide (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-) dan spesies radikal bebas seperti H_2O_2 dan *singlet* oksigen (1O_2). ROS selalu diproduksi selama proses fisiologis normal, dan dengan mudah menginisiasi peroksidasi membran lipid, sehingga memicu akumulasi lipid peroksidasi. Pada kondisi patologis, terjadi produksi berlebih ROS dan menghasilkan lipid peroksidasi.

Pemberian ekstrak *A. vera* mampu meningkatkan produksi Ca^{2+} sitoplasmik atau pembentukan ROS, sehingga mematikan mikroorganisme melalui mekanisme induksi apoptosis (Dutta *et al.* 2007). Kandungan *A. vera* yang menstimulasi pembentukan ROS adalah anthraquinone (Xia *et al.* 2007).

Nitric oxide (NO) adalah spesies molekul gas radikal bebas yang berperan penting pada patogenesis *Salmonella*. NO diproduksi pada sistem biologi, hasil konversi L-arginin menjadi L-citrulline oleh *NO synthase* (NOS). NO banyak diproduksi ketika terjadi reaksi imunologis. Hasil penelitian Haque (2012) menunjukkan bahwa produksi NO pada penderita demam tipoid disebabkan oleh meningkatnya ekspresi sitokin, dan bukan karena induksi *isoform of nitric oxide synthase* (iNOS). Produksi NO bergantung pada konsentrasi L-arginin sebagai donor fisiologis nitrogen. Hal ini menunjukkan bahwa suplemen L-arginin efektif digunakan untuk meningkatkan produksi NO secara *in vivo*. Hasil penelitian sebelumnya juga mengungkapkan bahwa NO dan antibiotik memberikan efek terapi yang efisien pada infeksi *S. typhimurium* (Haque 2011). NO yang dihasilkan *S. typhimurium* dilaporkan mampu membunuh sel kanker (Barak *et al.* 2010).

Molekul NO adalah produk makrofag yang teraktivasi oleh sitokin, komponen mikroba atau keduanya. NO merupakan derivat asam amino L-arginin oleh aktivitas enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), merupakan molekul tumorisidal dan antimikroba secara *in vitro* dan *in vivo*. NO berperan pada banyak peran sistem imun dan berbagai sistem organ (Bogdan 2001). NO juga merupakan pembawa pesan seluler yang beraktivitas melalui berbagai mekanisme, antara

Tabel 1. Produksi ROS pada mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Ulangan ke-	Kontrol	P1	P2	P3
1	1,52	2,40	2,40	2,30
2	1,53	2,20	2,12	2,20
3	1,54	2,12	2,10	2,40
4	1,55	2,08	2,10	2,20
5	1,54	2,12	2,06	2,30
6	1,52	2,10	2,00	2,10
Rerata	1,53±0,17	2,17±0,12	2,17±0,12	2,25±0,08

Keterangan:

Kontrol : Tanpa diberi gel *Aloe vera*

P1 : Diberi gel *Aloe vera* 0,5 ml/ekor/hari

P2 : Diberi gel *Aloe vera* 1,0 ml/ekor/hari

P3 : Diberi gel *Aloe vera* 1,5 ml/ekor/hari

Tabel 2. Hasil Uji *Mann Whitney U* Produksi ROS makrofag

Kelompok	K	P1	P2	P3
Kontrol				
P1	0,003 ^a			
P2	0,004 ^a	0,492		
P3	0,003 ^a	0,149	0,117	

^aSuperscript huruf menunjukkan perbedaan nyata pada taraf 5%

lain aktivasi guanilat siklase, nitrosilasi thiol dan pembentukan peroksinitrit. Aktivitas NO bergantung pada kondisi oksidasi dalam sel. Pada syaraf motorik, NO meningkatkan *brain-derived neurotrophic factor*, melalui stimulasi produksi cGMP. Tanpa faktor tropik, NO menginduksi apoptosis neuron melalui reaksi dengan superoksida menjadi peroksinitrit. Mekanisme induksi apoptosis lebih kompleks dibanding pembentukan oksidan kuat dan menurunkan pembentukan cGMP (Estevez & Jordan 2002).

Molekul NO meregulasi respon kemotaktik melalui berbagai mekanisme. NO memodulasi produksi kemokin (seperti IP-10, *monocyte chemoattractant protein-1* dan *macrophage inflammatory protei-1α dan 2α*). NO juga mampu menghambat aktivitas kemokin (seperti IL-8) melalui *peroxynitrite-dependent tyrosine nitration* dan fungsinya sebagai pembawa pesan intraseluler pada jalur signal pembentukan kemokin. NO juga berperan sebagai regulator pada migrasi limfosit. NO dapat menekan produksi selektin, yaitu *Vascular Adhesion Molecule (VCAM)*, *Intracellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)*, E-selectin (CD62E) dan P-selectin

(CD62P), sehingga mengurangi kekuatan ikatan pada dinding pembuluh darah. Akibatnya, siklus perpindahan leukosit sekitar endotel terhambat dan migrasi dari pembuluh darah memakan waktu yang lebih lama (Bogdan 2001).

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa *A. vera* memiliki berbagai efek fisiologis terhadap tubuh, yaitu antiinflamasi, antioksidan, antikanker, antidiabetes dan mengaktifasi makrofag (Grover *et al.* 2002; Krishnan 2006; Xiao *et al.* 2007; Xu *et al.* 2008). Pemberian *A. vera* secara umum menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis dan proliferasi sistem retikuloendotelial (Im *et al.* 2005). *Aloe vera* juga terbukti mampu menstimulasi imunitas seluler maupun imunitas humoral serta menstimulasi proliferasi stem sel hematopoietik, terutama sel *granulocyte macrophage colony-forming*, dan sel *forming myeloid* dan *erythroid colonies* (Im *et al.* 2005; Boudreau & Beland 2006). Pengaruh imunostimulasi dari *A. vera* tergantung pada aktivasi sel imun *innate* (makrofag, neutrofil, limfosit dan sel NK), sintesis dan pelepasan sitokin (TNF- α , IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6 and IL-8), pembentukan respon imun seluler,

pembentukan ROS dan induksi pembentukan *nitric oxide* (NO) (Leung *et al.* 2004; Pugh *et al.* 2001; Im *et al.* 2005; Boudreau & Beland 2006).

Komponen polisakarida utama pada *A. vera* yang berperan sebagai imunomodulator dikenal sebagai *acemannan*. Peningkatan imunitas oleh *A. vera* telah banyak dibuktikan. *Aloe vera* mampu menghambat perkembangan *Staphylococcus* dan *Candida* spp. *Acemannan* ((1,4)-linked acetylated mannan) mampu meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag, menstimulasi proliferasi limfosit di limpa dan sumsum tulang, serta meningkatkan ekspresi sitokin IL-1, IL-6 dan TNF α . *Acemannan* juga dilaporkan mampu menstimulasi sel TH2 (Tan & Vanitha 2004).

Acemannan mampu meningkatkan *respiratory burst*, fagositosis dan aktivitas candidacidal. Peningkatan fungsi makrofag berasosiasi dengan *binding mannosylates bovine serum albumins* (mBSA) terhadap reseptor mannose-makrofag. *Acemannan* dapat menstimulasi produksi sitokin seperti IFN- γ , TNF- α dan interleukin terutama oleh makrofag. Studi pada manusia, *acemannan* ini mampu meningkatkan respon limfosit terhadap allogen dengan meningkatkan pelepasan IL-1 oleh monosit (Roitt *et al.* 2001).

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian *A. vera* meningkatkan jumlah sel T CD4 dan CD8, serta IgG (Leung *et al.* 2004; Sampedro *et al.* 2004; Boudreau & Beland 2006). Hasil penelitian Vahedi *et al.* (2011) menunjukkan bahwa pemberian *A. vera* pada kelinci mampu meningkatkan jumlah sel T CD4 pada hari ke 14 dan ke 21 hari, sementara jumlah sel T CD8 meningkat pada hari ke 7, 14 dan 21 hari. Lebih lanjut disebutkan bahwa konsentrasi IgG dan IgM pada serum juga meningkat pada hari ke 7, 14 dan 21. Aktivitas stimulasi oleh *A. vera* dilaporkan terjadi melalui induksi sintesis dan pelepasan beberapa sitokin seperti TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2 and IL-6 (Qiu *et al.* 2000; Leung *et al.* 2004; Im *et al.* 2005; Boudreau & Beland 2006). Peningkatan IgG serum setelah pemberian *A. vera* mungkin juga berkontribusi pada peningkatan respon imun humoral akibat peningkatan limfosit T CD4 dan sintesis sitokin.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat diketahui bahwa pemberian gel *Aloe vera* berpengaruh signifikan terhadap peningkatan produksi ROS makrofag mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Terdapat perbedaan secara signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, P2 dan P3, tetapi tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok P1, P2 dan P3. Pemberian gel *Aloe vera* dosis 0,5 ml/ekor/hari sudah mampu meningkatkan produksi ROS makrofag. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang NO dan sitokin-sitokin yang berperan dalam respon imun terhadap *S. typhimurium* terutama IL-12, TNF- α , IFN- γ yang berperan menstimulasi sel NK (*Natural killer*) dan sel T untuk mengaktifasi makrofag sehingga mampu meningkatkan proses *killing* terhadap bakteri tersebut.

Daftar Pustaka

- Abbas AK & Lichtman AH. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth edition. Philadelphia: WB & Saunders
- Adrianus W, van der Velden M, Copass MK, Starnbach MN. 2005. *Salmonella* inhibit T cell proliferation by a direct, contact-dependent immunosuppressive effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(49): 17769-17774
- Barak Y, Schreiber F, Thorne SH, Contag CH, deBeer D & Matin A. 2010. Role of nitric oxide in *Salmonella typhimurium*-mediated cancer cell killing. *BMC Cancer* 10: 146-150
- Baratawidjaja KG. 2001. *Imunologi Dasar*. Edisi 5. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature* 2(10): 907-916
- Boudreau MD & Beland FA. 2006. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. *J Environ Sci Health C*. 24: 103-154
- Chakravorty D, Hansen-Wester I & Hensel M. 2002. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediated protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med*. 195: 1155-1166
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Sean K. Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL & Clarke MF. 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458: 780-783
- Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C & Chatterjee M. 2007. *Aloe vera* leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 56(5): 629-636
- Eguchi M & Kikuchi Y. 2010. Binding of *Salmonella*-specific antibody facilitates specific T cell responses via augmentation of bacterial uptake and induction of apoptosis in macrophages. *J Infect Dis* 201(1): 62-70

- ElSohly MA, Gul W & Murphy TP. 2004. Analysis of the anthraquinones aloe-emodin and aloin by gas chromatography/mass spectrometry. *Int Immunopharmacol* 4(14): 1739-1744
- Esteban A, Zapata JM, Casano L, Martin M & Sabater B. 2000. Peroxidase activity in *Aloe barbadensis* commercial gel: Probable role in skin protection. *Planta Med.* 66(8): 724-727
- Estevez AG & Jordan J. 2002. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Ann NY Acad Sci.* 962: 207-211
- Gassem MH. 2001. *Typoid Fever, Clinical and Epidemiological Studies in Indonesia*. Thesis. Semarang: Diponegoro University Semarang
- Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, Bose N, Chan ASH, Magee AS, Danielson ME, Weiss A, Vasilakos JP & Underhill DM. 2011. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature* 472: 471-475
- Grover JK, Yadav S & Vats V. 2002. Medical plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol* 81: 81-100
- Hamman JH. 2008. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules.* 13: 1599-1616.
- Haque SS. 2011. Therapeutic effect of nitric oxide and antibiotic against *Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis Immun* 3(15): 258-261
- Haque SS. 2012. *Estimation of nitric oxide metabolites and antibiotic against typhoid*. 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology. Singapore: IPCBEE
- Hawley LB. 2003. *Intisari Mikrobiologi dan Penyakit Infeksi*. Terjemahan Pendit BU. Jakarta: Hipokrates
- Hu Y, Xu J & Hu Q. 2003. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. *J Agric Food chem.* 51: 7788-7791
- Im SA, Oh ST, Song S, Kim MR, Kim DS, Woo SS, Jo YI & Lee CK. 2005. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *Int Immunopharmacol.* 5: 271-279
- Kaufman HE. 2001. *Immune Response to Intracellular Bacteria. Clinical Immunology Principles and Practice*. St. Louis: Mosby
- Kresno SB. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi 4. Jakarta. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Krishnan P. 2006. The scientific study of herbal wound healing therapies: current state of play. *Curr Anaesth Crit Care* 17: 21-27
- Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, Kim K, Han SS & Lee CK. 2001. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 1(7): 1275-84
- Leung MYK, Liu C, Zhu LF, Hui YZ, Yu B & Fung KP. 2004. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. *Glycobiol.* 14: 501-510
- McSorley SJ, Asch S, Costalonga M, Reinhardt RL & Jenkins MK. 2002. Tracking *Salmonella*-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated. *Infect Immun.* 16(3): 365-377
- Mills PC, Richardson DJ, Hinton JCD & Spiro S. 2005. Detoxification of nitric oxide by the flavorubredoxin of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem Soc Trans* 33: 198-199
- Mohamed EAK. 2011. Antidiabetic, antihypercholesteremic and antioxidative effect of *Aloe vera* gel Extract in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Aust J Basic Appl Sci.* 5(11): 1321-1327
- Pugh N, Ross SA, ElSohly MA & Pasco DS. 2001. Characterization of aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem.* 49:1030-1034
- Qiu Z, Jones K, Wylie M, Jia Q & Orndorf S. 2000. Modified *Aloe barbadensis* polysaccharide with immunoregulatory activity. *Planta Med.* 66: 152-156
- Rishi P, Rampuria A, Tewari R & Koul A. 2008. Phytomodulatory potentials of *Aloe vera* against *Salmonella* OmpR-mediated inflammation. *Phytother Res* 22: 1075-1082
- Roitt I, Brostoff J & Male D. 2001. *Immunology*. Sixth edition. Toronto: Mosby Elsevier Science Limited
- Saleem R, Faizi S, Siddiqui BS, Ahmed M, Hussain SA & Qazi A. 2001. Hypotensive effect of chemical constituents from *Aloe barbadensis*. *Planta Med.* 67(8): 757-760
- Sampedro MC, Artola RL, Murature M, Murature D, Ditamo Y, Roth GA & Kivatinitz S. 2004. Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. *Int Immunopharmacol.* 4: 411-418
- Santoso S. 2002. SPSS versi 12. *Mengolah data statistik secara profesional*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo
- Saritha V, Anilakumar K R & Khanum F. 2010. Antioxidant and antibacterial activity of *Aloe vera* gel extracts. *IJPBA* 1(4): 376-384
- Schepetkin IA & Quinn MT. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6(3): 317-333
- Shirwan H, Mhoyan A, Yolcu ES, Que XY & Ibrahim S. 2003. Chronic cardiac allograft rejection in a rat model disparate for one single class I MHC molecule is associated with indirect recognition by CD4+ T cells. *Transplant Immunol.* 11: 179-185
- Tan BKH & Vanitha J. 2004. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: A review. *Curr Med Chem.* 11: 1423-1430
- Vahedi G, Taghavi M, Maleki AK & Habibian R. 2011. The effect of *Aloe vera* extract on humoral and cellular immune response in rabbit. *Afr J*

- Biotechnol.* 10(26): 5225-5228
- Vazquez-Torres A & Fang FC. 2001. Oxygen-dependent anti *Salmonella* activity of macrophages. *Trends Microbiol.* **9**: 29-33
- Vecchione A, Catchpole B, D'Mello F, Kanellos T & Hamblin A. 2002. Modulating immune responses with dendritic cells: An attainable goal in veterinary medicine. *Vet Immunol Immunopathol.* **87**: 215-221
- West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS & Ghosh S. 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **472**: 476-480
- Xia Q, Boudreau MD, Zhou YT, Yin JJ & Fu PP. 2011. UVB Photoirradiation of *Aloe vera*- formation of free radicals, singlet oxygen, superoxide, and induction of lipid peroxidation. *J Food Drug Anal.* **19**(4): 396-402
- Xia Q, Yin JJ, Fu PP & Boudreau MD. 2007. Photo-irradiation of *Aloe vera* by UVA-formation of free radicals, singlet oxygen, superoxide, and induction of lipid peroxidation. *Toxicol Lett* **168**(2): 165-75
- Xiao BX, Guo JM, Liu DH & Zhang S. 2007. Aloe-emodin induces in vitro G2/M arrest and alkaline phosphatase activation in human oral cancer KB cells. *Oral Oncol.* **43**: 905-910
- Xu FG, Liu Y, Zhang ZJ, Song R, DongHJ & Tian Y. 2008. Rapid simultaneous quantification of five active constituents in rat plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after oral administration of Da-Cheng Qi decoction. *J Pharm Biomed Anal* **47**: 586-595
- Yagi A & Takeo S. 2003. Anti-inflammatory constituents, aloeosin and aloemannan in *Aloe* species and effects of tanshinon VI in *Salvia miltiorrhiza* on heart. *Yakugaku Zasshi.* **123**(7): 517-532