
EFEK OPSONISASI SERUM TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG YANG TERPAPAR AGREGAT BAKTERI ACTINOMYCETEMCOMITANS SETELAH PEMBERIAN MINYAK ATSIRI TEMU PUTIH

(EFFECT OF SERUM OPSONIZATION ON THE ACTIVITY OF MACROPHAGE CELL PHAGOCYTOSIS EXPOSED TO ACTINOMYCETEMCOMITANS AFTER ADMINISTRATION OF CURCUMA ZEDORIA VOLATILE OIL)

Juni Handajani

Bagian Biologi Mulut
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta 55281
E-mail: junihandajani@yahoo.com

Abstract

Macrophage is a phagocytic mononuclear cell that plays an important role in innate and adaptive immune response. Polysaccharide extract of *Curcuma zedoaria* could increase the phagocytic activity *in vitro*. The aim of this study was to investigate the effect of serum opsonisation on the macrophage phagocytic activity after the administration of *Curcuma zedoaria* Rosc. volatile oil. The subjects were 10 male Wistar rats, which divided into two groups (treatment and control), each group consisted of 5 rats. In the treatment group, 30,6 µl/ml *Curcuma zedoaria* volatile oil was administered orally for 14 days and the control group used aquabidest. In the 7th day, 100 µl *A. actinomycetemcomitans* in CMC 2% were applied on the anterior gingival mandible for 7 days. In the 15th day, rats were anesthetized then blood was collected from plexus retroorbitalis to make serum. *Latex beads* were incubated in the serum for 1 hour. Phagocytosis assay of peritoneal macrophages cells was performed using opsonized latex beads. Staining used Giemsa 20% then phagocytic activity was determined by counting index and percentage of phagocytic under light microscope. Data was analyzed using t-test. The result showed that it was a significant difference ($p < 0.05$) between serum opsonisation on the macrophage phagocytic activity after the administration of *Curcuma zedoaria* volatile oil. In conclusion, serum opsonisation can increase the macrophage phagocytic activity after the administration of *Curcuma zedoaria* volatile oil.

Key words: volatile oil, *Curcuma zedoaria* Rosc, macrophage, phagocytic activity

Abstrak

Makrofag sebagai sel fagosit mononuklear berperan dalam respons imun *innate* dan adaptif. Ekstrak polisakarida temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) secara *in vitro* diketahui dapat meningkatkan aktivitas fagositosis. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek opsonisasi serum terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag yang telah diinduksi minyak atsiri temu putih. Subjek penelitian adalah 10 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 2 kelompok (perlakuan dan kontrol), masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Kelompok perlakuan diberi minum minyak atsiri temu putih dosis 30,6 µl/ml dan kelompok kontrol diberi akuabides selama 14 hari pada hari ke-7. Gingiva anterior rahang bawah tikus diolesi *A. actinomycetemcomitans* sebanyak 100 µl dalam CMC 2% setelah pemberian minum. Pada hari ke-15, tikus pada masing-masing kelompok dianestesi lalu diambil darahnya dari *plexus retroorbitalis* untuk pembuatan serum. *Latex beads* diinkubasi dalam serum tikus selama 1 jam. Uji fagositosis makrofag peritoneal dilakukan terhadap *latex beads* teropsonisasi. Pewarnaan menggunakan Giemsa 20% lalu dilakukan pengamatan aktivitas fagositosis dengan menghitung indeks dan prosentase fagositosis di bawah mikroskop cahaya. Data dianalisis menggunakan uji t. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna efek opsonisasi serum terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag yang telah diinduksi minyak atsiri temu putih ($p < 0,05$). Sebagai kesimpulan, opsonisasi serum mampu meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag yang telah diinduksi minyak atsiri temu putih.

Kata kunci: minyak atsiri, temu putih, makrofag, aktivitas fagositosis

PENDAHULUAN

Makrofag berasal dari sel punca (*stem cell*) sumsum tulang kemudian berkembang menjadi monosit yang selanjutnya dilepaskan dalam sirkulasi darah. Monosit menyusun sekitar 3-7% dari total sel darah putih yang beredar di sirkulasi. Dalam waktu sekitar 2 hari atau lebih, monosit akan emigrasi ke jaringan selanjutnya disebut sebagai makrofag. Sel makrofag tersebut akan menetap di jaringan (histiosit). Makrofag diketahui lebih aktif dalam melakukan fagositosis dibandingkan monosit dan lebih banyak memiliki granula dengan kandungan ezim hidrolitik.¹

Monosit dari darah bermigrasi ke hampir setiap organ dalam tubuh untuk selanjutnya tumbuh menjadi makrofag tetap. Makrofag sebagai sistem fagosit mononuklear yang tersebar di seluruh jaringan ikat, *basement* membran pembuluh darah, sinusoid hati, limpa, paru-paru, sumsum tulang dan kelenjar getah bening.²

Fagositosis merupakan proses penelanan partikel seperti bakteri, parasit sel *host* yang mati atau debris sel oleh sel fagositik. Proses fagositosis meliputi 6 tahapan yaitu *delivery* sel fagositik ke tempat terjadinya infeksi, perlekatan sel fagosit ke target (sasaran), penelanan partikel target, pembentukan fagolisosom, pembunuhan intraseluler dan intraseluler digesti.² Sel fagositosis terdiri atas neutrofil (leukosit polimorfonuklear), eosinofil, monosit dan makrofag (leukosit mononuklear).³ Makrofag memiliki umur lebih panjang dibandingkan neutrofil. Neutrofil diketahui berperan dalam fagositosis tahap infeksi akut sedangkan makrofag terutama pada infeksi kronis. Makrofag juga memiliki fungsi sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) kepada limfosit. Proses ini diperlukan untuk inisiasi respons imun adaptif *host*.^{3,4}

Proses *delivery* sel fagositik ke tempat terjadinya infeksi melalui 2 tahap yaitu diapedesis dan kemo-taksis. Aktivitas fagositosis diinisiasi oleh perlekatan partikel ke permukaan membran plasma sel fagosit. Tahap ini biasanya melibatkan beberapa reseptor permukaan pada membran sel fagosit. Tiga reseptor utama pada sel fagosit akan mengenali bagian Fc molekul antibodi IgG yaitu IgG monomerik, *antigen-crosslinked* IgGs dan faktor komplemen C3b. Reseptor lain dapat berikatan dengan fibronektin dan oligosakarida terminasimannose. Pada keadaan infeksi tertentu, bakteri atau virus dapat dilapisi substansi (seperti IgG, C3b, fibronektin atau mannose). Mikroba yang dilapisi substansi tersebut disebut mikroba teropsosisasi. Substansi seperti IgG (terutama IgG₁ dan IgG₃) atau komplemen C3b yang melapisi permukaan mikroba disebut faktor opsonin. Opsonin memberikan ligan

ekstrinsik untuk reseptor spesifik pada membran sel fagosit yang secara drastis akan meningkatkan kecepatan perlekatan (*adherence*) dan ingesti partikel patogen. Bakteri teropsosisasi dapat dibersihkan dari aliran darah oleh sel fagosit tetapi banyak tipe bakteri nonopsosisasi tidak dapat dibersihkan.⁴

Ada tiga jenis utama opsonin yaitu antibodi IgG (IgG₁ dan IgG₃), fragmen dari C3b dan lektin. Masing-masing dapat bertindak sebagai jembatan antara partikel dan sel fagositik. Protein fase akut (seperti *C reactive protein/CRP*) dapat mengikat ke permukaan mikroorganisme dan memiliki struktur yang mirip dengan C1, mengaktifkan jalur komplemen klasik, hal ini menunjukkan opsonisasi oleh komplemen. Molekul yang berikatan dengan IgG (Fc gamma reseptor atau FcγR) dan berikatan dengan karbohidrat (lektin) akan selalu menstimulasi ingesti segera yang diikuti dengan interaksi ligan-reseptor. Sebaliknya, reseptor fragmen-C3 tidak aktif dan memerlukan sinyal lebih lanjut dalam bentuk fibronektin atau protein fase akut sebelum aktivasi, namun C3b pada permukaan bakteri atau jamur dapat mengikat CR3 dan memicu fagositosis oleh karena adanya interaksi antara polisakarida pada permukaan mikroba dan sisi *lektin-like* pada CR3.^{4,5}

Temu putih banyak digunakan sebagai jamu di Indonesia, antara lain sebagai bahan utama jamu sesudah melahirkan, juga sebagai stomatakum, karmminativum, tonikum, penawar gigitan ular, pengobatan luka dan ulser. Rimpang dan minyak atsiri temu putih mengandung sejumlah senyawa seskui-terpen termasuk kurkumin dan derivat-derivatnya. Minyak atsiri rimpang temu putih berupa cairan kental kuning emas mengandung 1) monoterpen hidrokarbon (α-pinen, D-kamfen), monoterpen alkohol (D-borneol), monoterpen keton (D-kamfor), monoterpenoksida dan sineol, dan 2) seskui-terpen golongan: bisabolan, eleman, germakran, eudesman, guaian dan spiro-lakton.⁶ Kandungan minyak atsiri pada *Curcuma zedoaria* juga dilaporkan berupa 1,8 cineol (18.5%), cymene (18.42%), α-phellan-drene (14.9%).^{6,7}

Komponen ekstraksi metanolik temu putih yang berefek sebagai anti inflamasi terhadap telinga tikus adalah *furanodiene* dan *furano-dienone*.⁷ Fraksi polisakarida temu putih dosis 1 mg/ml diketahui dapat meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag peritoneal RAW 264.7.⁸ Daya antimikroba ekstrak temu putih pernah diteliti oleh Bugno pada dosis 100 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml dan 1000 mg/ml terhadap *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.⁹

Aggregatibacter actinomycetemcomitans sebelum

nya dikenal dengan *Actinobacillus actionmycetem-comitans* (Aa) merupakan bakteri Gram-negatif fakultatif non-motil berbentuk batang. Bakteri ini komensal di rongga mulut tetapi sering ditemukan pada plak gigi, poket periodontal maupun sulkus gingiva. Adanya bakteri ini sering dikaitkan pada berbagai infeksi pada manusia seperti *endocarditis*, *brain abscesses* dan penyakit periodontal. Bakteri dan produknya dapat menstimulasi keadaan inflamasi. Keadaan inflamasi jaringan mukosa rongga mulut akibat infeksi bakteri akan menginisiasi sel-sel pertahanan rongga mulut untuk bekerja memfagosit bakteri patogen.¹⁰

Penelitian ini menggunakan dosis 30,6 µl/ml, hal ini sesuai hasil penelitian Naz dkk.¹¹ yang menyatakan daya antimikroba temu putih terhadap *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus licheniformis* and *Azotobacter* pada konsentrasi berkisar 4-28 mg/ml *in vitro*. Dosis minyak atsiri 28 mg/ml atau setara dengan 30,6 µl/ml. Permasalahannya adalah efek opsonisasi serum terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag terpapar *A. actionmycetemcomitans* setelah pemberian minyak atsiri temu putih belum diketahui sehingga diharapkan hasil penelitian ini dapat memberi informasi ilmiah mengenai efek opsonisasi serum terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag setelah pemberian minum minyak atsiri temu putih.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental murni yang dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Prosedur penelitian telah mendapat persetujuan dari Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (No. 301/ KKEP/ FKGUGM/EC/ 2012 tanggal 3 Agustus 2012).

Determinasi tanaman temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe) dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM (No. BF/ 189/ Ident/Det/VI/2012) tanggal 25 Juni 2012. Prosedur destilasi minyak atsiri temu putih dilakukan di LPPT UGM. Rimpang temu putih seberat 2833 gram menghasilkan 3 ml minyak atsiri konsentrasi 100%.

Tikus Wistar jenis kelamin jantan usia 3 bulan sebanyak 10 ekor dibagi menjadi 2 kelompok masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Tikus kelompok perlakuan diberi minum minyak atsiri temu putih dosis 30,6 µl/ml dan pada kelompok kontrol, tikus hanya diberi minum akuabides. Masing-masing tikus diberi minum sesuai kelompoknya setiap hari sebanyak 1 ml selama 14 hari. Gingiva anterior rahang bawah tikus diolesi *A.*

actinomycetem-comitans sebanyak 100 µl dalam CMC 2% pada hari ke-7 setelah pemberian minum minyak atsiri temu putih dan akuabides. Pengolesan bakteri tersebut dilakukan selama 7 hari.

Pada hari ke-15, tikus Wistar dianestesi menggunakan Ketamin hidroklorida 10% (Ketamil[®]) dengan dosis 100 mg/kg berat badan secara intramuscular. Pengambilan darah dari plexus retroorbitali menggunakan tabung mikrohematokrit. Darah diambil sebanyak ± 2 ml lalu ditampung dalam tabung sentrifugasi yang telah diberi antikoagulan *Ethylene Di-methyle Tetraacetic Acid* (EDTA) dengan dosis 1-2 mg/ml darah. Serum diperoleh dengan cara sampel darah kelompok perlakuan dan kontrol didiamkan sampai menjendal (±60 menit) lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1300 rpm selama 15 menit.

Ekstraksi sel makrofag peritoneal diawali pengolesan seluruh permukaan perut menggunakan alkohol 70%, lalu dibuat irisan kecil sampai tampak peritoneum. Medium RPMI yang mengandung 2% FBS disuntikkan sebanyak 10 ml ke dalam rongga peritoneum menggunakan jarum suntik ukuran 25 gauge dan spuit injeksi ukuran 10 ml, ditunggu selama 2 menit sambil ditekan secara perlahan. Pengambilan cairan peritoneal dengan aspirasi dari rongga peritoneum di daerah kuadran kiri bawah abdomen. Cairan peritoneal diaspirasi dengan spuit injeksi sebanyak 10 ml. Aspirat yang diperoleh selanjutnya ditampung dalam tabung lalu disentrifugasi pada 1.200 rpm, 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang lalu pelet ditambahkan 3 ml medium RPMI sebanyak 3 ml.

Viabilitas sel ditentukan menggunakan larutan *trypan blue* lalu dihitung jumlah sel dengan *hemocytometer*. Sel makrofag yang *viable* (hidup) akan tampak bening atau tidak berwarna karena *trypan blue* tidak dapat memasuki membran sel. Makrofag yang mati akan menyerap warna sehingga tampak berwarna biru.¹²

Pelet diresuspensi dengan medium RPMI sehingga diperoleh suspensi makrofag dengan kepadatan sebanyak $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Suspensi sel selanjutnya ditanam dalam *microplate* 24 well yang dasar *platennya* telah diberi *coverslip* bulat. Setiap sumuran diisi suspensi sel sebanyak 200µl ($2,5 \times 10^5$ sel). *Microplate* selanjutnya diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C 5% CO₂ selama 30 menit lalu ditambahkan media RPMI sebanyak 1 ml tiap sumuran, selanjutnya inkubasi lagi selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali kemudian ditambahkan medium RPMI 1 ml tiap sumuran dilanjutkan inkubasi lagi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Uji fagositosis nonspesifik dilakukan *in vitro* dengan menggunakan *latex beads* berdiameter 3µm.

Latex beads yang akan digunakan untuk uji fagositosis terlebih dahulu diopsonisasi dengan cara direndam dalam serum tikus dari kelompok perlakuan dan kontrol selama 1 jam. Suspensi makrofag yang telah dikultur 24 jam, dicuci 2 kali dengan RPMI. *Latex beads* diresuspensikan ke dalam PBS sehingga diperoleh konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml. Suspensi *latex beads* ditambahkan dalam tiap sumuran sebanyak 200 μ l selanjutnya *microplate* diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C selama 60 menit. Pencucian spesimen 3 kali dengan PBS pada kecepatan 250 rpm masing-masing selama 10 menit untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit. Fiksasi menggunakan *methanol absolute* sampai kering dilanjutkan pengecatan *coverslip* menggunakan Giemsa 20% selama 30 menit lalu *mounting*. Pengamatan dan penghitungan indeks fagositosis dilakukan menurut Macura.¹³

HASIL

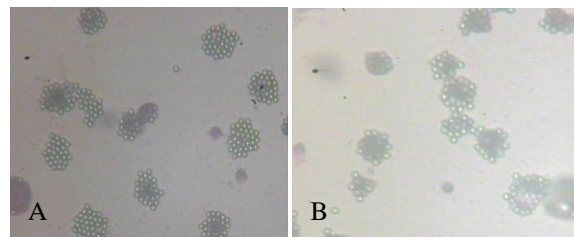
Hasil isolasi sel makrofag peritoneal akan tampak bersinar (Gambar 1) dan perhitungan viabilitas sel menunjukkan 95%.



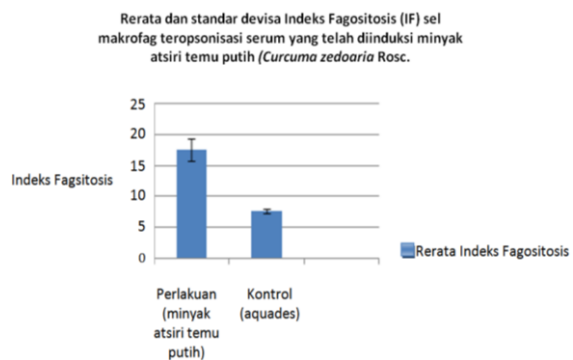
Gambar 1. Sel makrofag peritoneal tikus Wistar tampak bening terang dalam medium RPMI (lingkaran)

Aktivitas fagositosis sel makrofag telah dipapar *A. actinomycetemcomitans* setelah pemberian minyak atsiri (perlakuan) dan akuades (kontrol) ditampilkan pada Gambar 2.

Hasil pengamatan pada Gambar 2 tampak bahwa aktivitas fagositosis meningkat drastis setelah pemberian minyak atsiri. Hal ini dapat diamati pada kelompok perlakuan tampak satu sel makrofag mampu memfagosit sampai sekitar 35 partikel *latex beads* (Gambar 2) sedangkan kelompok kontrol hanya sekitar 12 partikel. Hasil perhitungan indeks fagositosis ditampilkan dalam Gambar 3.



Gambar 2. Aktivitas fagositosis makrofag terhadap *latex beads* teropsonisasi setelah pemberian minyak atsiri temu putih (perlakuan) dan akuades (kontrol). Tampak sel makrofag kelompok perlakuan (A) mampu melakukan aktivitas fagositosis *latex beads* lebih tinggi dibanding kontrol (B)



Gambar 3. Rerata dan standar deviasi indeks fagositosis makrofag terhadap *latex beads* teropsonisasi serum yang telah diinduksi minyak atsiri temu putih (perlakuan) dan akuades (kontrol)

Hasil perhitungan normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan $p > 0,05$ atau dapat dikatakan data terdistribusi normal. Hasil uji-t diperoleh hasil $p = 0,00$, sehingga dapat diinterpretasikan bahwa terdapat perbedaan bermakna induksi minyak atsiri temu putih terhadap aktivitas fagositosis makrofag dibandingkan kontrol. Hasil perhitungan persentase fagositosis (PF) yaitu 126,86%. Hasil ini dapat dikatakan bahwa induksi minyak atsiri temu putih akan meningkatkan 1 kali aktivitas fagositosis makrofag terhadap *latex beads* teropsonisasi.

PEMBAHASAN

Makrofag berperan penting dalam semua fase pertahanan inang (*host*) baik respons imun alami (*innate*) maupun adaptif pada kasus infeksi. Ketika agensia patogen melewati barier epitel, makrofag akan mulai proses fagositosis dengan penelanan dan digesti dengan bantuan enzim lisosomal pada sitoplasma. Pada penelitian ini dapat diketahui bahwa paparan bakteri *A. actinomycetemcomitans* pada gingiva tikus mampu mengaktifkan makrofag untuk melakukan fagositosis, meskipun efek aktivasi bak-

teri tersebut dapat dikatakan kecil. Hal ini dapat diketahui dari rerata indeks fagositosis kelompok kontrol lebih rendah dari kelompok perlakuan (Gambar 3).

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas fagositosis meningkat drastis setelah pemberian minum minyak atsiri temu putih selama 14 hari. Aktivitas fagositosis juga semakin meningkat setelah sel makrofag diopsonisasi dengan serum dari tikus kelompok perlakuan (Gambar 2). Peningkatan aktivitas fagositosis ini diduga pemberian minum minyak atsiri temu efektif untuk meningkatkan produksi protein larut (*solubel*) yang mampu untuk aktivitas makrofag seperti TNF- α . *Tumour Necrosis Factor- α* merupakan sitokin pleiotropik yang terlibat dalam berbagai proses biologis tubuh seperti reaksi imun dan inflamasi. Khususnya TNF- α beraksi dengan cara mengaktifasi makrofag untuk proses penelanan mikroorganisme dengan memacu *pathway respiratory burst-dependent* dan *NO-dependent killing*.¹⁴ Hasil ini didukung oleh hasil penelitian *in vitro* maupun *in vivo* bahwa kandungan ekstrak kasar dan fraksi polisakarida temu putih mampu meningkatkan produksi TNF- α dan NO pada sel makrofag peritoneal RAW 264,7. Protein larut seperti TNF- α dan NO juga diketahui sebagai molekul kunci yang berefek pada aktivasi makrofag untuk berinteraksi dengan sel imun yang lain, sehingga temu putih memiliki potensi sebagai bahan imunomodulator.⁸

Aktivitas fagositosis yang meningkat drastis terlihat setelah opsonisasi serum dari tikus yang diberi minum minyak atsiri temu putih. Hal ini mungkin disebabkan minyak atsiri temu putih berefek secara *in vivo* sehingga serum yang dihasilkan oleh tikus kelompok perlakuan telah mengandung protein larut untuk aktivasi makrofag secara *autocrine* maupun *paracrine*. Adanya paparan bakteri *A. actionmycetomcomitans* diduga sebagai stimulator bagi makrofag untuk mensekresikan sitokin yang berfungsi meningkatkan aktivitas bagi makrofag sendiri (*autocrine*) maupun meningkatkan aktivitas sel lain di sekeliling makrofag (*paracrine*).^{1,3,15}

Aktivitas fagositosis makrofag meningkat setelah perendaman *latex beads* dengan serum kemungkinan ada beberapa mekanisme. Pertama pada *latex beads* telah terbentuknya selubung *serum complement protein*. Protein tersebut dikenal dengan opsonin sebagai penanda bakteri atau benda asing bagi makrofag untuk difagositosis.¹⁵ Molekul protein tersebut akan melakukan opsonisasi dengan menempel pada permukaan makrofag melalui mekanisme pengenalan oleh reseptor khusus *serum complement protein* yang terdapat pada membran plasma sel makrofag. Reseptor tersebut adalah CR1 untuk komponen C4b dan C3b serta CR3 dan CR4 untuk

komponen C3bi. Selanjutnya *latex beads* akan mengalami internalisasi langsung ke dalam makrofag, tanpa melalui pembentukan pseudopodia, sehingga proses fagositosis menjadi lebih cepat.¹⁶ Diketahui bahwa makrofag memiliki reseptor untuk C3b untuk berikatan dengan partikel yang dilapisi komplemen (*complementcoated*). Reseptor lain yaitu adanya molekul opsonin yang mengikat IgG (Fc gamma *receptors*/Fc γ R) kemudian ikatan karbohidrat (*lectins*) tersebut akan selalu aktif dan menstimulasi ingesti segera (*immediate*) yang diikuti interaksi *ligandreceptor*.^{15,16} Hal ini juga dapat diketahui dari banyaknya *latex beads* yang difagosit pada kelompok perlakuan. Efek opsonisasi dari serum yang telah diaktivasi dengan minyak atsiri temu putih juga dapat diketahui jumlah makrofag yang melakukan fagositosis pada kelompok perlakuan. Hasil berbeda tampak pada kelompok kontrol terlihat hanya sedikit makrofag yang melakukan fagositosis maupun jumlah *latex beads* yang difagosit (Gambar 2). Dapat disimpulkan bahwa opsonisasi serum mampu meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag yang telah diinduksi minyak atsiri temu putih.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Fakultas Kedokteran gigi Universitas Gadjah Mada yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana Masyarakat tahun 2012. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Siti Fatimah, Ristini Asih, dan Antinah Latif yang telah membantu persiapan penelitian.

Daftar Pustaka

1. Abbas AK, Lichtman AH, Phillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 2013; 50-55.
2. Samaranayake L. Essential microbiology for dentistry. 4th ed. Hongkong: Elsevier, 2012; 100-15.
3. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. Immunobiology: The immune system in health and disease. 7th ed. New York: Garland Science, 2008; 219-20.
4. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2010; 35-50.
5. Eales LJ. Immunology for life scientist. 2nd ed. England: Wiley, 2003; 90, 216-24.
6. Sunardi C, Dewi PNL, Sutedja L, Kardono LBS. Studi aktivitas antimikroba minyak atsiri dari rimpang *Kaempferia rotunda* L., *Curcuma zedoaria* Rosc. dan *Curcuma mangga* Val. Et ZIJP. Dalam: Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI. Surabaya: 27-28 Maret 2002.

7. Makanabe H, Maru N, Kuwabara A, Kamo T, Hirota M. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*, <http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200501/ai_n9474296> 18 Maret 2008.
8. Carvalho FR, Vassão RC, Nicoletti MA, Maria D, Carvalho FR. Effect of *Curcuma zedoaria* crude extract against tumor progression and immunomodulation. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2010; 16(2): 326-41.
9. Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. *Braz J Microbiol* 2007; 38(3): 427-32.
10. Aberg CH, Sjödin B, Lakio L, Pussinen PJ, Johansson A, Claesson R. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16-year clinical and microbiological follow-up study. *J Clin Periodontol* 2009; 36(10): 815-22.
11. Naz S, Jabeen S, Iyas S, Manzoor F, Aslam F, Al A. Antibacterial activity of *Curcuma Longa* varieties against different strains of bacteria. *Pak J Bot* 2010; 42(1): 455-62.
12. Bio Research. Protocol for performing a trypan blue viability test technical reference guide <<http://bio.lanza.com>> (24 November 2012).
13. Macura N, Zhang T, Casadevall A. Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1904-15.
14. Jang MK, Lee HJ, Kim JS, Ryu JH. A curcuminoid and two sesquiterpenoids from *Curcuma zedoaria* as inhibitors of nitric oxide synthesis in activated macrophages. *Arch Pharm Res* 2004; 27(12): 1220-5.
15. Pollard TD, Earnshaw WC. Lippincott-Schwartz J. *Cell biology*. 2nd ed. New York: Saunders, 2008: 525.
16. William EP. *Fundamental immunology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003; 552.