dentika Dental Journal , Vol 15, No. 2, 2010: 170-174

PENINGKATAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT BALB/C DENGAN IMUNOSUPRESI DAN DIINFEKSI C.ALBICANS AKIBAT PEMBERIAN MINYAK BIJI MIMBA

(INCREASING MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS ACTIVITY IN BALB/C MICE THAT IMMUNOSUPRESSED AND INFECTED WITH *C.ALBICANS* CAUSED BY OLEUM AZADIRACHTY)

Iin Eliana Triwahyuni

Departemen Oral Medicine,
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jl. Kalimantan I/37 Jember,
e-mail: iin.triwahyuni@ yahoo.com

Abstract

Majority of fungal infection in mouth is caused by *C.albicans*. This case increases parallel with increasing the number of immunosupressed patient. Mimba (*Azadirachta indica*) is herbal medicine that has been used as antifungal drug. Beside that, mimba has immunostimulatory effect. Macrophage phagocytosis, it's one of natural immunities that plays an important role in the first immune response againts *C.albican* infection.The purpose of this research was to know the effect of oleum azadirachty in macrophage phagocytosis activity of BALB/c mice that immunosupressed and infected by *C.albicans*. This laboratory experimental research used BALB/c mice that immunosupressed and infected by *C.albicans*, divided into three groups: group 1 (negative control), group 2 (positive control, were immunosupressed and infected with *C.albicans*), group 3 (was immunosupressed, infected with *C.albicans*, and given 75 µl oleum azadirachty). Mice were immunosupressed given by 2-3mg/mice subcutan injection of prednisolon one day before infected. Group 2 and group 3 were given tetracycline hydrochloride in drinking water (0,83mg/ml) since one day before infected. *C.albicans* inoculation was given at zero day. On the 2nd day post infection, mice were acclimated and the macrophage phagocytosis activity was evaluated by latex beat. Data was analysed by One Way Anova test and LSD (p=0.05). The result showed that there was significant difference between group 2 and group 3. In conclusion, oleum azadirachty could increase macrophage phagocytosis activity.

Key words: *C.albican*, immunosupression, oleum azadirachty, macrophage, phagocytosis

PENDAHULUAN

Sejak lebih dari tiga decade yang lalu, angka kejadian infeksi jamur di rongga mulut mengalami peningkatan, seiring dengan peningkatan jumlah pasien yang mengalami imunosupresi.[1] Sebagian besar kasus infeksi jamur di rongga mulut disebabkan oleh jamur *Candida albicans,* penyakitnya disebut kandidiasis mulut, dan kasus kandidiasis mulut ini sering ditemukan di praktek dokter gigi.[2]

Selama ini terapi kandidiasis mulut menggunakan obat antijamur, antara lain azole,[3] tetapi pemakaian obat antijamur dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya resistensi terhadap kandida dan berbagai efek samping.[4] Hal ini menjadi faktor pendorong bagi masyarakat untuk memanfaatkan potensi obat tradisional khususnya yang berasal dari tumbuh-tumbuhan untuk pengobatan penyakit khususnya infeksi jamur.

Mimba (*Azadirachta Indica Juss*) telah dikenal masyarakat sebagai obat tradisional. Bagian tanaman yang paling sering digunakan untuk obat tradisional adalah daun dan bijinya.[5] Secara empiris, masyarakat telah memanfaatkan mamba untuk mengatasi berbagai macam penyakit, seperti cacingan, kudis, malaria, infeksi jamur, mengatasi tumor dan alergi dengan cara minum rebusan daun atau biji mimba.[6,7] Di bidang pertanian, biji mamba telah dimanfaatkan sebagai insektisida, anti patogen dan fungisida alami yang terbukti aman bagi manusia dan hewan. [5,8]

Candida albicans adalah flora normal rongga mu-

ISSN: 1693-671X)
Edisi Cetak Dentika Dental Journal, Desember 2010

Edisi Cetak Dentika Dental Journal (ISSN: 1693-671X) Vol 15 No 2, Desember 2010

lut yang menjadi penyebab utama terjadinya kandidiasis mulut. Kandidiasis mulut merupakan infeksi yang paling sering dijumpai di rongga mulut, karena hampir semua orang pernah mengalaminya. Faktor predisposisi kandidiasis mulut meliputi obat-obatan (terutama steroids dan antibiotik), iritasi lokal (gigi tiruan, alat ortodonsi, dan rokok), radiasi, usia, kehamilan, penyakit sistemik, dan malabsorbsi.[9] Infeksi kandida disebut oportunistik, karena organisme tersebut dapat menjadi patogen pada keadaan sistem pertahanan tubuh yang terganggu. Dengan demikian faktor pertahanan tubuh sangat penting untuk mencegah terjadinya kandidiasis. [10]

Respons imun tubuh sangatlah penting. Respons imunologik pada kandidiasis mulut belum banyak dipahami, namun diduga imunitas seluler lebih banyak berperan, meskipun respons humoral dan non spesifik juga ikut berperan. Pada infeksi *C. albicans*, interaksi yang terjadi antara *C.albicans* dengan pejamu melibatkan sell fagosit. Sel fagosit memegang peranan yang sangat penting, karena fagositosis yang diperankan oleh makrofag dan *Polymorpho Nuclear* (PMN) merupakan imunitas alami yang berperan dalam respon imun terdepan untuk melawan infeksi *C.albicans*. Pada hospes yang imunokompromis, dapat terjadi transisi *C. albicans* menjadi patogen oportunistik dan penyebarannya yang luas.[11]

Berdasarkan apa yang diuraikan di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan minyak biji mimba dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag mencit BALB/c dengan imunosupresi dan di infeksi *C.albicans*. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat kemampuan minyak biji mimba dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag mencit BALB/c dengan imunosupresi dan diinfeksi *C.albicans*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini adalah eksperimental murni secara in vivo dan in vitro dengan menggunakan model mencit BALB/c. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan tiga kelompok perlakuan, yaitu: kelompok 1 (kontrol negatif), kelompok 2 (kontrol positif : imunosupresi dan diinfeksi *C.albicans*), kelompok 3 (perlakuan: imunosupresi, diinfeksi, dan diberi minyak biji mimba 75 µl). Tiap kelompok dilakukan dengan enam kali pengulangan, sehingga total sampel 18 ekor. Di gunakan mencit betina, umur 6-10 minggu, berat 20-30 gram. Sebelumnya mencit diadaptasi selama seminggu diberi makan dan minum secara "*ad libitum*".

Prosedur pembuatan minyak biji mimba yaitu dengan cara menghancurkan biji mimba yang telah dikeringkan kemudian diekstraksi dengan menggunakan alat ekstraksi *soxhlet* dengan pelarut hekans selama 3-4 jam. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diproses dengan alat *rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut dengan minyak, sehingga diperoleh minyak biji mimba. [12]

Prosedur perlakuan pada mencit dengan infeksi kandidiasis mulut, dilakukan dengan cara mencit diimunosupresi dengan prednisolon (PDS) 100 mg/kg BB (2-3 mg/mencit) secara subkutan sehari sebelum diinfeksi dengan *C.albicans*. Tetrasiklin hidroklorid diberikan dalam air minum (0,83 mg/ml) sehari sebelum diinfeksi, selanjutnya mencit dianastesi dengan injeksi im 50µl dari 2 mg klor- promazin klorid/ml pada daerah paha. *Cotton bud* dimasukkan ke dalam suspensi *C.albicans* ($2,5x10^7$ sel/ml yang diukur dengan haematositometer) dan diulaskan ke seluruh permukaan rongga mulut untuk menimbulkan infeksi. Minyak biji mimba sebanyak 75 µl diberikan secara intragastrik dengan menggunakan sonde lambung sehari sebelum diinfeksi sampai dengan hari ke-2 setelah diinfeksi *C.albicans*.[13]

Pengukuran aktivitas fagositosis makrofag dilakukan pada hari ke-2setelah diinfeksi *C.albicans.* Mencit diaklimasi, kemudian nodus limfe leher dieksisi. Setelah itu dibuat *single cell suspension* dengan cara *mechanical disruption* menggunakan *nylon mesh*. Suspensi sel nodus limfe leher dihitung dengan *haematocytometer* dan ditambahkan medium tumbuh sehingga didapatkan suspensi yang mengandung $2x10^5$ sel/ml, kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* 96 sumuran sebanyak 1ml/sumur. Sel makrofag dibiarkan melekat selama 2 jam. Sel yang tidak melekat dibuang, sedangkan sel yang melekat dicuci dengan RPMI tanpa Fetal Bovine Serum (FBS) sebanyak 2 kali, kemudian diinkubasi dengan medium tumbuh selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan uji fagositosis dengan cara makrofag yang telah dikultur selama 24 jam dicuci 2 kali. Uji fagositosis dilakukan dengan menggunakan *Latex beads* yang dicuci dengan PBS dan diresuspensikan dalam PBS sehingga diperoleh konsentrasi 10^6/ml. 200µl/500 µl lateks yang mengandung kepadatan sel lateks 10-20 kali kepada tansel makrofag ditambahkan ke dalam tiap sumuran dan diinkubasi selama 1 jam 37°C CO_2. Kemudian supernatan dibuang, dicuci dengan PBS 3x dan dikeringkan. Fiksasi dilakukan dengan menggunakan metanol absolut selama 30 detik, kemudian dikeringkan. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan menambahkan Giemsa selama 30 menit dan dicuci dengan destiled H_2O, kemudian *coverslip* diangkat dari sumur dan

dentika Dental Journal , Vol 15, No. 2, 2010: 170-174

dikeringkan pada suhu ruangan. Hasilnya diperiksa di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 400x. Uji fagositosis makrofag secara kuantitatif: dalam 100 makrofag dilakukan dengan menghitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel lateks. [14]

Data dianalisis dengan uji Anova satu arah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar perlakuan terhadap aktivitas fagositosis makrofag. Untuk mengetahui lebih lanjut apakah ada perbedaan rerata antar kelompok dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*) dengan taraf kepercayaan $p < 0,05$.

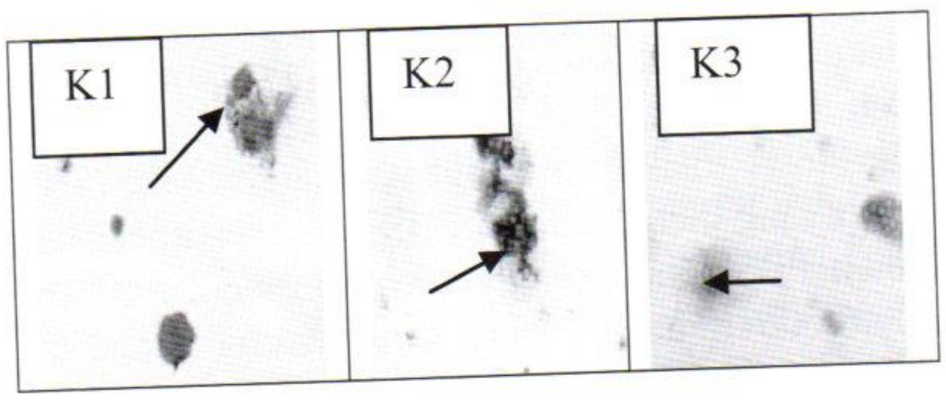
HASIL

Hasil penghitungan aktivitas vagositosis makrofag diperoleh dari jumlah makrofag yang memakan partikel latex tiap 100 makrofag. Hasilnya menunjukkan bahwa kelompok K3 mempunyai aktivitas vagositosis makrofag yang lebih besar dibanding kelompok K2, namun lebih kecil dibanding kelompok K1 (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah rerata makrofag yang memakan partikel lateks berdasarkan kelompok.

Kelompok	Rerata makrofag
Kontrol negatif	60 ± 2
Kontrol positif	47 ± 3
Perlakuan	57 ± 2

Pada pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x, tampak partikel lateks berupa bola-bola kecil transparan, dan sel makrofag tampak berwarna merah ungu dengan ukuran lebih besar dibanding partikel lateks. Pada sel-sel makrofag yang sedang aktif memfagositosis tampak partikel lateks menempel maupun masuk ke sitoplasma makrofag (Gambar 1).



Gambar 1. Sel makrofag yang aktif memakan partikel latex (tanda panah), pengama-tan pada hari ke-2 post infeksi. K1: kontrol negatif, K2: kontrol positif, diimunosupresi dan diinfeksi *C.albi-cans*, K3: diimunosupresi, diinfeksi *C.albicans*, dan diberi minyak biji mimba dosis 75 µl. Pembesaran 400x dengan pengecatan Giemsa.

Ada perbedaan bermakna aktivitas fagositosis antara kelompok kontrol negatif (K1) dengan kelompok kontrol positif (K2) dan antara kelompok kontrol positif (K2) dengan kelompok yang diberi minyak biji mimba (K3). Tidak ada perbedaan bermakna aktivitas fagositosis pada kelompok yang diberi minyak biji mimba (K3) dengan kelompok kontrol negatif (K1) (Tabel 2).

Tabel 2. Uji LSD aktivitas fagositosis makrofag antar kelompok

Kelompok	K1	K2	K3
K1	-	0,000*	0,268
K2		-	0,002*
K3			-

*= berbeda bermakna

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, pembuatan model mencit imunosupresi dilakukan dengan pemberian obat imunosupresan yaitu prednisolon dengan mengacu pada penelitian yang dilakukan Takakura pada tahun 2004. Prednisolon dipilih karena kerja obat ini melalui penekanan terhadap proliferasi sel limfosit T yang sangat berperan dalam eliminasi *C.albicans*. Model mencit pada penelitian ini selain diberikan prednisolon juga diberikan antibotik dengan tujuan mencegah terjadinya infeksi sekunder dari bakteri yang tidak diharapkan. Selain itu, antibiotik membunuh atau menekan bakteri sehingga *C.albicans* lebih berpeluang untuk tumbuh dan pemakaian antibiotik merupakan salah satu faktor predisposisi terjadinya kandidiasis mulut.

Aktivitas fagositosis diamati dalam penelitian ini karena merupakan komponen sistem imun *innate* yang berperan sebagai sensor terhadap rangsangan dari luar. Adanya respons terhadap rangsangan dari luar dalam penelitian ini dievaluasi melalui imunitas pada *cervical lymph node*, karena merupakan salah satu sistem imunitas di rongga mulut. Sistem imunitas rongga mulut ini selanjutnya akan mempengaruhi sistem imunitas sistemik melalui sistem vaskuler.

Dalam penelitian ini minyak biji mimba diberikan secara *oral* yaitu melalui sonde lambung. Selanjutnya komponen-komponen di dalamnya dapat diabsorbsi dengan cepat dalam mukosa membran usus dan dengan cepat diedarkan dalam darah, dengan *half life* dalam plasma lima jam, kemudian dengan cepat diabsorbsi ke dalam jaringan.

Adanya peningkatan aktivitas fagositosis makrofag (Tabel 1) pada kelompok dengan perlakuan dengan minyak biji mimba (K3) dibandingkan K2,

Edisi Cetak Dentika Dental Journal, Desember 2010 (ISSN: 1693-671X)

membuktikan bahwa minyak biji mimba dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan hal ini menunjukkan bahwa minyak biji mimba dapat berperan sebagai imunostimulator. Hal ini dapat terjadi karena diduga mimba mengandung komponen imunostimulator seperti *galic acid, epicatechin*, dan *catechin* yang dapat berfungsi sebagai pemacu sinyal yang diaktivasi CD14 ataupun dapat secara langsung meningkatkan aktivitas makrofag.[15]

Makrofag merupakan sel dalam sistem imun *innate* yang bertugas sebagai sensor terhadap stimuli dari luar. Infeksi *C.albicans* dan perlakuan dengan minyak biji mimba merupakan rangsangan dari luar yang tentu saja menimbulkan respon makrofag. Untuk menjalankan fungsi sensor tersebut, makrofag dilengkapi berbagai reseptor yang dapat mengenali rangsangan dari luar. Berbagai reseptor (berupa molekul permukaan) terdapat pada permukaan makrofag dan dapat mengenali atau berinteraksi dengan *self* maupun *non-self*. Reseptor yang dapat mengenali *non-self* yang dimiliki makrofag antara lain: reseptor manosa, *scavenger receptor* (reseptor bangkai), dan TLR (*Toll Like Receptor*). *C.albicans* menyebabkan *down regulation* pada TLR2 dan TLR4 yang diduga berperan penting dalam mengaktifkan faktor transkripsi NF-kB (*Nuclear Factor kappa Beta*) , menstimuli aktivitas fagositosis dan produksi sitokin.[15,21,22] TLR merupakan protein homologous pada membran APC yang berfungsi sebagai reseptor fungsional yang mengaktifkan leukosit untuk menimbulkan respon imun innate. Secara *invitro* telah diketahui ikatan antara CD14, TLR2, dan TLR4. CD14 merupakan *glikosylphosphatidylinositol* yang berikatan dengan protein yang diekspresikan pada permukaan sel, terutama makrofag. CD14 tidak dapat mengikat protein mikroba secara langsung, tetapi harus berikatan dengan ligan. Selanjutnya interaksi ini mempengaruhi aktivitas TLR yang penting dalam *signal transduction*. Kombinasi CD14 dengan TLR akan menginduksi NF-kB yang dihubungkan dengan respons imun yang dapat melepas sitokin, seperti TNFα. Telah terbukti bahwa pemberian mimba terhadap tikus dapat meningkatkan ekspresi CD14, TLR2, dan TLR4, sehingga diduga mimba mempunyai komponen imunomodulator yang mengaktivasi CD14 yang selanjutnya akan meningkatkan respon TLR2 dan TLR4.[15]

TLR2 dan TLR4 yang diaktivasi akan mempengaruhi *phosphatidylinositol* pada membran sel makrofag sehingga mengaktifkan protein Rac yang selanjutnya akan mengaktivasi NF-kB dan AP-1 melalui *jun* kinase melalui jalur MAPK (*The mitogen-activated protein kinase*). MAPK mempunyai tiga jalur yang dapat diaktivasi dalam waktu yang bersamaan, yaitu: ERK, JNK, dan P_{38}. Aktivitas jun dipengaruhi oleh ERK. Aktivitas ERK dan P_{38} dapat mengaktivasi AP-1. NF-kB berperan sebagai regulator respons awal terhadap patogen dan merupakan aktivator respons imun. NF-kB merupakan protein heterodim erp 50-p65 yang mentranskripsi bermacam-macam gen. Untuk aktivasi NF-kB diperlukan fosforilasi protein IkB yang mendegradasi p50-p65 sehingga berada dalam nukleus dan mengaktifkan bermacam-macam gen antara lain gen yang mempengaruhi produksi TNFα dan aktivitas fagositosis. TNFα meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dalam membunuh patogen.[16]

Pada penelitian ini, pada kelompok K1 (tidak diinfeksi,tidak diimunosupresi, dan tidak diberi minyak biji mimba) juga terdapat sel makrofag yang aktif memfagositosis (Tabel 1). Kemungkinan hal ini terjadi karena sangat sulit mendapatkan rongga mulut hewan coba yang benar-benar steril dari *C.albicans*. Selain itu, secara fisiologis aktifitas fagositosis juga terjadi. Sebagai kesimpulan, terdapat peningkatan yang nyata aktivitas fagositosis makrofag mencit BALB/c dengan imunosupresi dan diinfeksi *C. Albicans* akibat pemberian minyak biji mimba (*Oleum Azadirachty*).

DAFTAR PUSTAKA

1. Bagtzoglou AD, Fidel PL. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal Candidiasis, J Dent Res 2005; 84(11): 966-77.
2. Ashman RB, Farah CS, Wanasaengsakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in Candida albicans infection, J Immun and Cell Biol 2004; 82: 196–204.
3. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance, J Clin Microb 1998; 11 (2): 382-402.
4. Liu L, Kang K, Takahara M, Cooper RD, Ghannoum MA. Hyphae and yeasts of Candida albicans differentially regulate interleukin-12 production by human blood monocytes: inhibitory role of C. albicans germination, J Infec and Immun 2001; 69 (7): 4695.
5. Sukrasno. Mimba tanaman obat multifungsi. Jakarta: Agromedia Pustaka; 2003: 8-15
6. Ganguli S. *Neem : A therapeutic for all seasons.* Current Science 2002; 82(11): 193-201.
7. Goel RK, Sairam K, Anti ulcer drugs from indigenous source with emphasis on musa sapientum, tamrabhasma, asparagus racemous and zingiber officinale. Indian J Pharmacolo 2002; 34:100-107.
8. Tran, Yuichi D,Junko C, Eiji T, Hiroyuki T, Mitsushiro M, et al. Kava root (piper mythysticum) as a potential natural herbicide and fungicide. Crop Protection 2003;22:873-8819.
9. Simatupang MM. Candida albicans. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara; 2009: 6-7

Edisi Cetak Desember 2010 (ISSN: 1693-671X)
Dentika Dental Journal, Desember 2010 (ISSN: 1693-671X)

10. Baratawijaya KG, Imunologi Dasar. ed 6. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2006; 91.
11. Kadowaki N, Stephen H, Svetlana A, Rene WM, Robert AK, Fernando B, Yong-JL, Subset of human dendritic cell precursor express different toll-Like receptors and respond to different microbial antigens. Experimental Medicine 2001; 194;6: 63-70.
12. Kusmardi, Kumala S, Triana EE. Efek imunologi ekstrak daun ketepeng Cina (*Cassia alata L*) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. Majalah Kesehatan 2007; 11 (2): 50-55
13. Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model, J Med Microb 2004; 54: 495–500.
14. Aurelia. Pengaruh pemberian rebusan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada mencit BALB/c yang diinfeksi Salmonella typhimurium. Artikel karya tulis ilmiah. FK Undip. 2006
15. Dewanti, Efek Ekstrak cair daun Mimba (Azadirachta indica) terhadap peningkatan fagositosis makrofag pada tikus wistar yang diinokulasi C.albicans, Disertasi. Unair, 2008: 85-90.
16. Newman SL, Angela H. Candida albican sisphagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. Infection and Immunity 2001: 69(11): 6813-22.

(ISSN: 1693-671X)

Edisi Cetak Desember 2010 (ISSN: 1693-671X)

Dentika Dental Journal, Desember 2010 (ISSN: 1693-671X)