

PENURUNAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG MENCIT SETELAH DISTIMULASI MINYAK ATSIRI KENCUR TERHADAP *ACTINOBACILLUS* *ACTINOMYCETEMCOMITANS*

(REDUCING OF PHAGOCYTOSIS ACTIVITY OF MOUSE MACROPHAGE CELL AFTER
STIMULATION *KAEMPFERIA GALANGA LINNEUS* TOWARDS
ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS)

Tetiana Haniastuti

Bagian Biologi Mulut
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Denta, Sekip Utara, Yogyakarta

Abstract

Macrophage plays an essential role in innate immune system by phagocytosing bacteria. However, the phagocytosis process may activate macrophage to release inflammatory mediators which may cause tissue destructions in strong reaction. *Kaempferia galanga* L. is one of medical plants which is believed having potency as an immunomodulator agent. The aim of this study was to examine macrophage cells phagocytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after stimulated with *Kaempferia galanga*'s essential oil *in vitro*. Mouse peritoneal macrophages were incubated with 5%, 10%, and 20% of *Kaempferia galanga*'s essential oil at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. After 15 minutes, *A. actinomycetemcomitans* was added to the suspension and incubated for 30 minutes. At the end of the incubation period, the cells were assayed for the phagocytic activity. The result of this study showed that *Kaempferia galanga*'s essential oil significantly reduced the percentage of mouse macrophage cells phagocytosing *A. actinomycetemcomitans* and the number of phagocytosed *A. actinomycetemcomitans* per 1 macrophage cell *in vitro* (p<0,05). In conclusion, *Kaempferia galanga*'s essential oil may reduce mouse macrophage cells phagocytic activity of *A. actinomycetemcomitans*.

Key words: macrophage, phagocytosis, *Kaempferia galanga* linneus

PENDAHULUAN

Makrofag adalah sel yang berperan penting dalam sistem imunitas tubuh melawan patogen.¹ Salah satu peran utama makrofag dalam sistem imunitas alami adalah fungsi fagositosis, yang bertujuan untuk menyingkirkan partikel ekstraseluler, sel yang rusak atau mati, dan juga bakteri patogen.^{2,3}

Actinobacillus actinomycetemcomitans merupakan bakteri Gram negatif patogen, yang terlibat dalam patogenesis penyakit periodontal.⁴ *A. Actinomycetemcomitans* ditemukan dalam jaringan gingiva penderita *juvenile periodontitis*, *adult periodontitis*, dan *prepubertal periodontitis*.^{5,6} Bakteri ini diketahui mampu menstimulasi sel *host* untuk memproduksi mediator inflamasi yang dapat menimbulkan destruksi jaringan ikat dan resorpsi tulang alveolar.^{7,8}

Aktivasi makrofag merupakan bagian integral dari reaksi inflamasi yang terjadi selama infeksi bakteri berlangsung.⁹ Fagositosis *A. Actinomycetemcomitans* oleh sel makrofag memicu aktivasi makrofag untuk mensintesis berbagai mediator inflamasi, antara lain interleukin 1 (IL-1) dan tumor nekrosis faktor α (TNF- α)^{10,11}, yang apabila diproduksi dalam jumlah yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan jaringan.^{12,13}

Selama infeksi berlangsung, inflamasi berperan dalam membunuh bakteri patogen penyebab infeksi, akan tetapi secara klinis juga dapat menimbulkan kerusakan jaringan. Untuk itu diperlukan regulasi yang bertujuan untuk memungkinkan proses penyembuhan yang sempurna, antara lain dengan bahan yang bersifat imunomodulator. Pada saat ini semakin dikembangkan penelitian yang bertujuan untuk mencari bahan obat yang berasal dari alam.

Menurut Wagner dan Jurcic, tanaman obat yang mempunyai potensi sebagai imunomodulator dapat dipilih tanaman yang secara tradisional dipakai untuk penyakit yang berhubungan dengan sistem imunitas, seperti penyakit inflamasi, infeksi, ataupun alergi.¹⁴

Kencur (*Kaempferia galanga linneus*) merupakan salah satu tanaman obat yang banyak tumbuh di Indonesia. Minyak atsiri rimpang kencur terdiri atas *monoterpenoid*, *sesquiterpenoid* dengan komponen utama *ethylesthercinnamic acid* dan *ethylesther p-methoxycinnamic acid*, *borneol*, *camphene*, *p-methoxystyrene*, λ - Δ^3 -*carene*, *n-pentadecane*, dan *p-methoxystyrene*.¹⁵ Menurut Riyanto, turunan sinamat yang terdapat pada minyak atsiri kencur mempunyai aktivitas antara lain sebagai antipiretik dan analgetik.¹⁶ Sejak zaman dulu, rimpang kencur sering digunakan oleh masyarakat luas sebagai bahan obat tradisional untuk mengobati keluhan-keluhan yang berhubungan dengan inflamasi, misalnya sebagai obat sakit kepala, sakit perut, sakit gigi, dan reumatik.¹⁵ Namun, sampai saat ini belum ada data empiris yang mendukung bahwa kencur mempunyai efek imunomodulator.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek imunomodulator minyak atsiri kencur dengan meneliti aktivitas fagositosis sel makrofag mencit terhadap bakteri *A. actinomycetemcomitans* setelah distimulasi dengan minyak atsiri kencur *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Sel makrofag yang dipergunakan dalam penelitian ini diperoleh dari hasil isolasi sel makrofag peritoneal mencit Balb/C berumur 6-8 minggu. Suspensi sel makrofag dikultur dengan media RPMI 1640 dengan diberi suplemen *fetal calf serum* 10%, penicillin G (100 μ g/ml) dan streptomycin (100 μ g/ml).

Bakteri *A. actinomycetemcomitans* strain Y4 (serotipe b) ditumbuhkan secara anaerob dengan menggunakan media *Todd-Hewitt* yang diberi suplemen 1% ekstrak *yeast*. Minyak atsiri kencur diperoleh dengan cara destilasi dan dibuat konsentrasi 5%, 10%, dan 20% dalam solusi *poly ethylene glycol* (PEG) 5%.

Sel makrofag dengan konsentrasi 5×10^5 sel/sumuran dikultur dalam petri 24 sumuran yang sudah diberi *coverslip* bulat. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C yang mengandung 5% CO₂. Selanjutnya, minyak atsiri kencur konsentrasi 5%, 10%, dan 20% sebanyak 50 μ l ditambahkan pada suspensi makrofag dan diinkubasi selama 15 menit dalam inkubator dengan

suhu 37°C yang mengandung 5% CO₂. Pada kelompok kontrol digunakan PEG 5%, karena substansi ini digunakan sebagai bahan pengencer minyak atsiri kencur. Masing-masing kelompok dibuat replikasi sebanyak 3 kali. Setelah dicuci dengan RPMI, ditambahkan bakteri *A. actinomycetemcomitans* strain Y4 (serotipe b) sebanyak 10⁶ sel dan diinkubasi lagi selama 30 menit di inkubator dengan suhu 37°C yang mengandung 5% CO₂. Sel selanjutnya difiksasi dengan metanol, dan diwarnai dengan Giemsa 20%. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya, dan dilakukan perhitungan uji fagositosis¹⁷ yang meliputi: 1) jumlah makrofag yang memfagosit bakteri dari 100 sel makrofag; 2) jumlah bakteri yang difagosit oleh tiap sel makrofag yang memfagosit bakteri.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan persentase sel makrofag yang memfagosit bakteri *A. Actinomycetemcomitans* dengan bertambahnya konsentrasi minyak atsiri kencur (Tabel 1). Hasil uji Anova menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), membuktikan bahwa konsentrasi minyak atsiri kencur berpengaruh terhadap persentase makrofag yang memfagosit bakteri *A. Actinomycetemcomitans*.

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku jumlah sel makrofag yang memfagosit bakteri *A. Actinomycetemcomitans* per 100 sel makrofag

Konsentrasi minyak atsiri (%)	Jumlah sel makrofag yang memfagosit bakteri Rerata \pm SD
0	54.89 \pm 21.04
5	40.33 \pm 1.86
10	15.22 \pm 2.87
20	15.89 \pm 6.26

Hasil analisis dengan *Least Significance Difference* (LSD) menunjukkan bahwa terjadi penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) persentase makrofag yang memfagosit bakteri *A. Actinomycetemcomitans* antara kontrol bila dibandingkan dengan kelompok yang mendapat perlakuan minyak atsiri kencur konsentrasi 10% dan 20%. Penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) juga terdapat antara kelompok yang mendapat perlakuan dengan minyak atsiri kencur konsentrasi 5% bila dibandingkan dengan kelompok yang mendapat perlakuan minyak atsiri kencur konsentrasi 10% dan 20%. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) persentase makrofag yang memfagosit bakteri *A. Actinomycetemcomitans* an-

tara kontrol dengan kelompok yang mendapat perlakuan dengan minyak atsiri kencur konsentrasi 5%, serta antara kelompok yang mendapat perlakuan dengan minyak atsiri kencur konsentrasi 10% bila dibandingkan dengan 20%.

Tabel 2 juga menunjukkan penurunan jumlah bakteri yang difagosit oleh tiap sel makrofag yang memfagosit bakteri. Hasil uji Anova menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), membuktikan bahwa konsentrasi minyak atsiri kencur berpengaruh terhadap jumlah bakteri yang difagosit oleh tiap sel makrofag yang memfagosit bakteri. Hasil analisis dengan LSD menunjukkan penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) jumlah bakteri yang difagosit oleh tiap sel makrofag yang memfagosit bakteri antara kelompok yang mendapat perlakuan dengan minyak atsiri kencur konsentrasi 5%, 10%, dan 20% bila dibandingkan kontrol, namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) jumlah bakteri yang difagosit oleh tiap sel makrofag yang memfagosit bakteri antara kelompok yang mendapat perlakuan dengan minyak atsiri kencur konsentrasi 5% bila dibandingkan dengan 10% dan 20%, serta antara kelompok yang mendapat perlakuan dengan minyak atsiri kencur konsentrasi 10% bila dibandingkan dengan 20%.

Tabel 2. Rerata dan simpangan baku jumlah bakteri yang difagosit oleh tiap sel makrofag yang memfagosit bakteri

Konsentrasi minyak atsiri (%)	Jumlah bakteri yang difagosit Rerata \pm SD
0	3.54 \pm 0.44
5	2.71 \pm 0.36
10	2.78 \pm 0.01
20	2.52 \pm 0.30

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa minyak atsiri kencur mempunyai efek imunomodulator dengan menyebabkan menurunnya aktivitas fagositosis sel makrofag mencit, dalam hal ini terjadi penurunan jumlah makrofag yang memfagositosis bakteri dan jumlah bakteri yang difagosit oleh tiap sel makrofag yang memfagosit bakteri.

Fagositosis merupakan salah satu cara pertahanan tubuh melawan invasi bakteri, dengan menelan bakteri-bakteri patogen dan menghancurkannya.^{18,19} Pengenalan bakteri oleh sel fagosit berperan penting dalam proses fagositosis.^{20,21}

Mekanisme terjadinya penurunan aktivitas fagositosis sel makrofag tersebut belum dapat diketahui

dari penelitian ini, akan tetapi kemungkinan disebabkan karena zat aktif yang terkandung di dalam minyak atsiri kencur mampu mengganggu stabilitas protein permukaan membran sel makrofag. Terganggunya reseptor-reseptor yang terdapat pada permukaan sel makrofag, menyebabkan makrofag tidak mampu mengenali bakteri *A. Actinomycetemcomitans*.²⁰

Makrofag mengenali bakteri target melalui reseptor permukaan, yang spesifik terhadap komponen bakteri. Molekul CD14 yang terdapat pada permukaan sel makrofag mampu mengenali kompleks lipopolisakarida (LPS) dan *LPS-binding protein* (LBP) dan berperan penting dalam fagositosis bakteri *A. Actinomycetemcomitans* yang hidup.²² Pengikatan bakteri oleh reseptor yang terdapat pada membran makrofag merupakan langkah awal terjadinya fagositosis²⁰, sehingga apabila terjadi gangguan dalam pengenalan dan pengikatan bakteri *A. actinomycetemcomitans* oleh reseptor sel makrofag, akan menyebabkan penurunan aktifitas fagositosis.

Fagositosis merupakan suatu proses yang kompleks. Selain terjadi internalisasi bakteri atau benda-benda asing, juga memicu aktivasi sel makrofag untuk mensintesis berbagai enzim (*reactive oxygen intermediate*, *inducible nitric oxide synthase* dan *lysosomal protease*) dan sitokin (IL-1 dan TNF- α) yang bersifat toksik terhadap bakteri yang difagosit. Namun, apabila terjadi reaksi fagositosis yang berlebihan sehingga enzim dan sitokin tersebut disintesis dalam jumlah yang berlebihan, dan dilepaskan ke jaringan ekstraseluler dapat berakibat destruksi jaringan.^{19,20}

Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri kencur semakin menurun aktivitas fagositosis. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri kencur, semakin banyak zat aktif yang terkandung dalam minyak atsiri tersebut. Semakin banyak kandungan zat aktif, akan semakin mengganggu reseptor pada permukaan sel makrofag, dengan demikian aktivitas fagositosis juga akan semakin menurun.² Data hasil penelitian ini diketahui bahwa minyak atsiri kencur konsentrasi 10% sudah mampu menurunkan secara signifikan jumlah makrofag yang memfagosit bakteri *A. actinomycetemcomitans* maupun jumlah bakteri *A. actinomycetemcomitans* yang difagosit oleh tiap sel makrofag.

Kesimpulan penelitian ini adalah minyak atsiri kencur mampu menurunkan aktivitas fagositosis sel makrofag mencit terhadap *A. actinomycetemcomitans in vitro*. Penggunaan konsentrasi 10% merupakan konsentrasi yang efektif dalam menurunkan aktivitas fagositosis sel makrofag terhadap *A. Actinomycetemcomitans*.

Daftar Pustaka

1. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, et al. Macro-phage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 481-9.
2. Haas A. The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* 2007; 8:311-30.
3. Liu G, Wu C, Wu Y, Zhao Y. Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand J Immunol* 2006; 64: 1-9.
4. Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristic of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 1999; 20: 14-52.
5. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology* 2000 1999; 22: 136-67.
6. Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, Huang Y, Ohnishi M, Ishikawa I. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 201-7.
7. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avilla-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 12-20.
8. Ohguchi Y, Ishihara Y, Ohguchi M, Koide M, Shirozu N, Naganawa T, et al. Capsular polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* inhibits IL-6 and IL-8 production in human gingival fibroblast. *J Periodont Res* 2003; 38: 190-7.
9. Wang MH, Zhou YQ, Chen YQ. Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: potential regulators of macrophage inflammatory activities. *Scan J Immunol* 2002; 56: 545-53.
10. Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontology* 2000 1999; 20: 239-88.
11. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol* 2005; 32(Suppl. 6): 57-71.
12. Hou LT, Liu CM, Liu BY, Lin SJ, Liao CS, Rossomando EF. Interleukin-1 β , clinical parameters and matched cellular-histopathologic changes of biopsied gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodont Res* 2003; 38: 247-54.
13. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. *In vivo* administration of recombinant TNF- α promotes bone resorption in mice. *J Periodont Res* 2003; 38: 446-8.
14. Wagner H, Jurcic K. Assay for immunomodulation and effects on mediators of inflammation. *Methods Plant Biochem* 1991; 6: 195-215.
15. Duke JA. CRC-handbook of medicinal herbs. Florida: CRC-Press; 1985: 259.
16. Riyanto S. Transformasi p-metoksisinamid dari etil p-metoksisinamat yang diisolasi dari *Kaempferia galanga* L. In: Buku risalah seminar nasional metabolit sekunder. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM; 1987: 98.
17. Miyazaki A, Kobayashi T, Suzuki T, Yoshie H, Hara K. Loss of Fc γ receptor and impaired phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 1997; 32: 439-46.
18. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2001; 114:1061-1077
19. Bergman M, Salman H, Bessler H, Omanski M, Punskey I, Djaldetti M. Interaction between phagocytosis and IL-1 production by rat peritoneal macrophages. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 1-4.
20. Keisari Y, Kabha K, Schlepper-Schafer J, Ofek I. Phagocyte-bacteria interactions. *Adv Dent Res* 1997; 11: 43-9.
21. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology, Philadelphia: WB Saunders Co, 2001: 27-31.
22. Yates RM, Hermetter A, Taylor GA, Russell DG. Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 2007; 8: 241-50.