

ACTIVITY TEST OF IMMUNOMODULATORY COMPONENT FROM NEEM LEAVES TO CANDIDA ALBICANS

(UJI AKTIVITAS KOMPONEN IMUNOMODULATOR DARI NEEM TERHADAP CANDIDA ALBICANS)

I Dewa Ayu Ratna Dewanti*, I Dewa Ayu Susilawati*, Purwanto*, Depi Praharani**

* Departemen Biomedik

** Departemen Periodontik

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas of Jember

Jl. Kalimantan street 37, Jember 68121

E-mail: dewadewanti@yahoo.com

Abstract

Empirically, societies have utilized neem plant to treat worm infection, scabies, malaria, candidal infection, and allergy. Several researches have indicated that consuming neem leaves could improve antibody production. Our previous research had demonstrated the existence of immunomodulatory component in neem leaves weighted 70 and 100 kDA. The aimed of study was to test the activity immunomodulatory components to *Candida albicans*. This research was an in vitro study with rats as experimental subject. The rats were divided into three treatment groups and one control group, which were labeled as KO (no treatment), KP1 (inoculated by *C. albicans* only), KP2 (inoculated by *C. albicans* and were given the 70 kDA immunomodulatory component), KP3 (inoculated by *C. albicans* and were given the 100 kDA immunomodulatory component). In day 21, preparations from rats' tongue were done with immunohistochemistry staining and were analyzed for the activity of TNF- α macrophage phagocytosis and also for calculation of *C. albicans* colony from tongue swab. The result showed that there was no significant difference between the 70 and 100 kDA immunomodulatory components in increasing activity of TNF- α and macrophage phagocytosis and in decreasing the number of *C. albicans* colony. It was assumed that those components might activate NF- κ B and AP-1 that play role in protein transcription, which stimulated gene expression like TNF- α , which played role in phagocytosis. In conclusion, 70 dan 100 kDA immunomodulatory components increased the activity of TNF- α and macrophage phagocytosis and also decrease the number of *C. albicans* colony.

Key words: immunomodulator, *Candida albicans*, imunohistochemy, neem

PENDAHULUAN

Krisis multidimensional di Indonesia telah menimbulkan dampak terhadap menurunnya kesehatan masyarakat, ditandai dengan semakin meningkatnya penyakit infeksi. Salah satu penyakit infeksi yang paling banyak dijumpai adalah infeksi jamur (kandidiasis) yang terutama bermanifestasi di rongga mulut (kandidiasis oral). Pada umumnya, penderita kandidiasis akan datang ke dokter atau dokter gigi setelah kondisinya parah atau mengganggu, padahal infeksi ini seharusnya dicegah, karena dapat menjadi kelainan praganas (kandidal leukoplakia), di mana imunitas alami merupakan imunitas terdepan yang melawan *C. albicans* dan diperankan oleh makrofag. Makrofag berperan penting dalam melawan infeksi oleh *C. albicans*. Makrofag sebagai fagosit

profesional mengenali dan menghancurkan *C. albicans* melalui beberapa reseptor merangsang produksi substansi mikrobial melalui CD14 yang diekspresikan ke permukaan sel akan mengaktifkan *Toll-like receptors* (TLRs) serta NF- κ B.¹⁻³ Di sisi lain obat kimia menimbulkan efek samping dan harganya semakin mahal menyebabkan semakin tidak terjangkau masyarakat, sehingga diperlukan obat yang murah, mudah didapat dan denagn efek samping minimal.

Tanaman mimba (*Azadirachta Indica Juss*), secara empiris telah dikenal oleh masyarakat sebagai salah satu obat tradisional yang dapat mengatasi berbagai macam penyakit, seperti: cacangan, kudis, malaria, infeksi jamur, alergi dan kanker. Fenomena ini menunjukkan bahwa mimba mengandung komponen imunomodulator yang dapat memodulasi respons

imun. Beberapa penelitian membuktikan mimba memodulasi imunitas alami dan adaptif.⁴⁻⁹ Komponen imunomodulator dengan cepat diabsorpsi oleh membran usus dan diedarkan dalam darah setelah 45 menit diberikan secara per oral dengan *half-life* dalam plasma 5 jam, cepat diabsorpsi ke dalam semua jaringan tubuh dan sistem organ. Gugus OH pada komponen mimba bersifat polar, sehingga mudah berikatan dengan senyawa lain.¹⁰⁻¹² Artikel-artikel ilmiah terutama dari para penulis India telah banyak mengungkap berbagai aktivitas farmakologi daun mimba misalnya sebagai antijamur, antibakteri, antivirus, obat cacing, antialergi, anti kanker baik *in vitro* maupun *in vivo*.¹³⁻¹⁵

Penelitian tentang "Isolasi imunomodulator daun mimba serta uji aktivitasnya terhadap infeksi *C. albicans*", penting dilakukan karena memiliki aspek-aspek yang bermanfaat membantu memecahkan permasalahan kesehatan yang saat ini banyak dialami masyarakat.⁷⁻⁹ Permasalahannya adalah, komponen imunomodulator daun mimba belum banyak diteliti. Selain itu, secara spesifik potensinya untuk meningkatkan ketahanan terhadap infeksi jamur *C. albicans* belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini bertujuan membuktikan kemampuan komponen imunomodulator daun mimba yang poten untuk meningkatkan ketahanan terhadap *C. albicans*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dimulai dengan pembuatan ekstrak daun mimba. Sepuluh gram daun mimba dilarutkan dan ditaburi nitrogen cair kemudian digerus dan ditambahkan bufer yang mengandung SDS (1:2) dan digerus kembali sampai halus. Kemudian gerusan mimba disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm, selama 10 menit pada temperatur 15°C, supernatan dipisahkan dan siap untuk analisis kadar protein atau disimpan dalam suhu -20°C. Penelitian berikutnya menguji lebih lanjut reaksi protein daun mimba terhadap antibodi (IgG) dalam serum darah tikus yang telah mengonsumsi daun mimba, untuk mengidentifikasi adanya fraksi protein imunogenik. Analisis kadar protein dilakukan dengan metode Bradford menggunakan estándar BSA. Ekstrak cair daun mimba di runing dengan metode elektroforesis, sehingga diperoleh band yang menunjukkan profil SDS PAGE (fraksi daun mimba dan berperan sebagai antigen) dan dipindahkan ke membran nitrocelulose (NC). Antigen/Ag pada membran NC kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*mouse polyclonal antibody*)/darah tikus dengan cara dicelup semalam. Setelah itu, membran NC diinkubasi dengan antibodi sekunder (yang telah dilabel dengan

enzim pendeteksi alkalin fosfatase, *anti mouse IgG* label AP), yang akan berikatan dengan antibodi primer. Imunoreaktivitas antara antibodi primer dengan fraksi-fraksi antigen spesifik dapat dideteksi dengan cara mereaksikannya dengan substrat kromogen BCIB/NBT. Komponen imunomodulator yang telah diketahui BM nya diisolasi dari gel elektroforesis dengan cara elektroelusi (membran blot berupa pita biru), yaitu Band dipotong untuk dilakukan isolasi, kemudian dilakukan purifikasi. Hasil elektroelusi dipurifikasi dengan dialisis pada PBS kemudian pada dH₂O dengan cara dimasukkan ke dalam membran dialisis selama 24 jam, sehingga diperoleh suspensi komponen imunomodulator.

Penelitian ini merupakan studi *in vivo* dengan menggunakan 20 hewan coba tikus yang terbagi menjadi 4 kelompok, yaitu KO (tidak diberi perlakuan), KP1 (diinokulasi *C. albicans*), KP2 (diberi konsumsi komponen imunomodulator 70 KDA dan diinokulasi *C. albicans*), KP3 (diberi konsumsi komponen imunomodulator 100 KDA dan diinokulasi *C. albicans*). Hari ke 21 dibuat sediaan pada *Saburoud's agar* dari swab lidah dan dilakukan penghitungan koloni *C. albicans*. Selanjutnya dibuat sediaan lidah tikus, dan dilakukan analisis aktivitas TNF- α dan fagositosis makrofag dengan pengecatan imunohistokimia. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Anova, dilanjutkan uji LSD.

HASIL

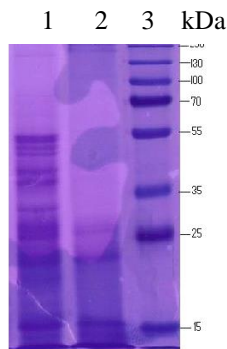
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembuatan ekstrak daun mimba dengan etanol tidak menghasilkan komponen imunomodulator, sedangkan dengan cara ekstrak tetes (pembuatannya seperti pada metode) dari perasan daun mimba menghasilkan komponen imunomodulator yang telah kami lakukan pada penelitian sebelumnya.

Pada Gambar 1 dapat dilihat profil protein daun mimba yang tidak terdenaturasi mengandung protein BM besar yakni antara 200-250 kDa, protein yang lain (sebagian besar) BMnya lebih kecil di bawah 30 kDa. Sedangkan pada daun mimba yang terdenaturasi tampak sebagian besar proteinnya memiliki BM di bawah 55 kDa.

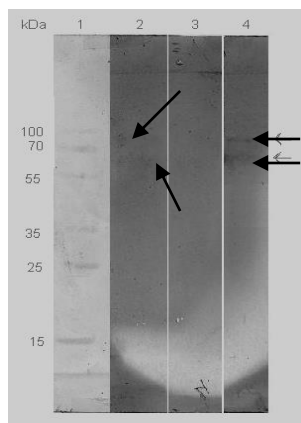
Hasil uji Western blotting, komponen imunomodulator yang ditemukan, adalah 70 dan 100 KDA.

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas komponen imunomodulator yang telah ditemukan pada penelitian sebelumnya (70 dan 100 KDA) terhadap TNF- α dan aktivitas fagositosis pada tikus yang diinokulasi *C. albicans*. Hasil ekspresi TNF- α dapat dilihat pada Gambar 3. Gambar 3 terlihat bahwa sel

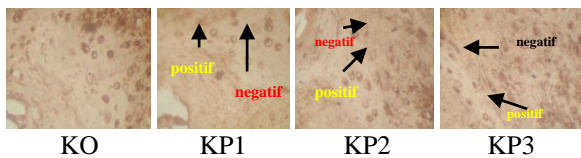
yang mengekspresikan TNF- α (sel warna coklat tua) pada KP2 dan KP3 berjumlah seimbang, sedangkan KP1 (diinokulasi *C. albicans* tanpa komponen imunomodulator) lebih sedikit.



Gambar 1. Profil protein daun mimba pada gel 12,5% pewarnaan *comassie brilliant blue*. 1: daun (denaturasi pemanasan 100°C, 5 menit), 2: daun tanpa denaturasi, 3: marker

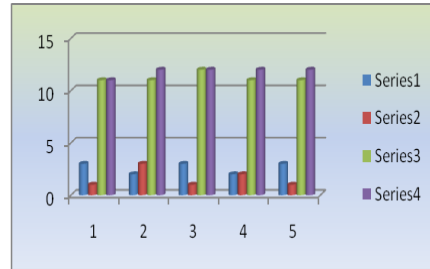


Gambar 2. Hasil Westernblotting yang menunjukkan reaksi protein daun mimba terhadap antibodi (IgG) tikus (rat polyclonal antibody). 1: marker, 2,3,4: fraksi protein mimba imunogenik (tanda panah)



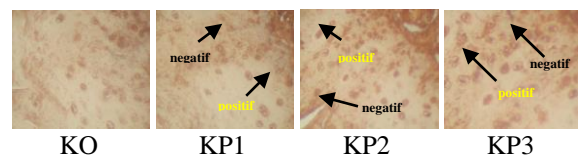
Gambar 3. Hasil Immunohistokimia aktivitas TNF- α . KO = Kelompok Kontrol, KP1= Kelompok Perlakuan 1 (diinokulasi *C. albicans*), KP2= Kelompok perlakuan 2 (diinokulasi *C. albicans* dan diberi konsumsi komponen imunomodulator 70 KDA), KP3= Kelompok perlakuan 3 (diinokulasi *C. albicans* dan diberi konsumsi komponen imunomodulator 100 KDA).

Hasil analisis statistik menggunakan Anova dan dilanjutkan uji LSD menunjukkan antara KP2 dengan KP3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan, sedangkan antara KO dengan kelompok perlakuan, KP1 dengan KP2, KP3 terdapat perbedaan signifikan (Gambar 4).



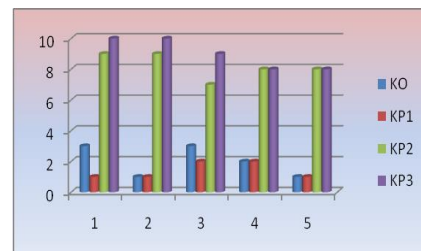
Gambar 4. Diagram batang TNF- α

Pada Gambar 5 terlihat sel makrofag yang aktif menfagosit (sel warna coklat tua) pada KP2 dan KP3 berjumlah seimbang, sedangkan KP1 (diinokulasi *C. albicans* tanpa komponen imunomodulator) lebih sedikit.



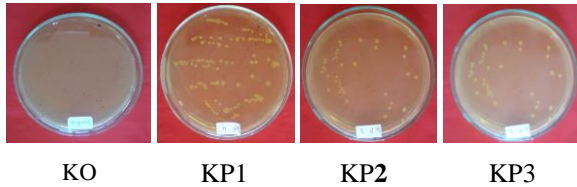
Gambar 5. Hasil Immunohistokimia aktivitas fagositosis. KO = Kelompok Control KP1= Kelompok Perlakuan 1 (diinokulasi *C. albicans*), KP2= Kelompok perlakuan 2 (diinokulasi *C. albicans* dan diberi konsumsi komponen imunomodulator 70 KDA), KP3= Kelompok perlakuan 3 (diinokulasi *C. albicans* dan diberi konsumsi komponen imunomodulator 100 KDA)

Analisis statistik menggunakan Anova dilanjutkan uji LSD antara KP2 dengan KP3, hasilnya tidak terdapat perbedaan yang signifikan, sedangkan antara KO dengan kelompok perlakuan, KP1 dengan KP2, KP3 terdapat perbedaan signifikan (Gambar 6).



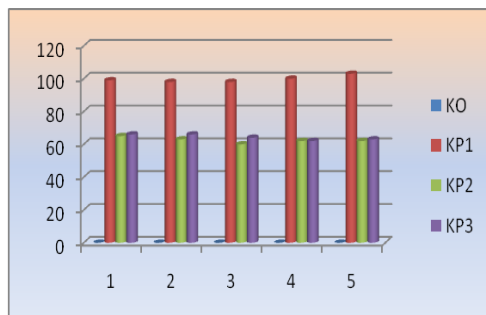
Gambar 6. Diagram batang aktivitas fagositosis

Hasil swab lidah yang ditumbuhkan pada *Sabouroud's agar* terlihat KO tidak terdapat koloni, KP1 banyak dijumpai koloni, sedangkan KP2 dan KP3 jumlah koloni seimbang (tidak berbeda nyata) (Gambar 7).



Gambar 7. Jumlah koloni *C. albicans*. KO = Kelompok Kontrol, KP1= Kelompok Perlakuan 1 (diinokulasi *C. albicans*), KP2= Kelompok perlakuan 2 (diinokulasi *C. albicans* dan diberi konsumsi komponen imunomodulator 70 KDA), KP3= Kelompok perlakuan 3 (diinokulasi *C. albicans* dan diberi konsumsi komponen imunomodulator 100 KDA)

Analisis statistik dengan Anova dan uji LSD menunjukkan antara KP2 dengan KP3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan, sedangkan antara KO dengan kelompok perlakuan, KP1 dengan KP2, KP3 terdapat perbedaan signifikan (Gambar 7).



Gambar 7. Diagram batang jumlah koloni *C. albicans*

PEMBAHASAN

Penelitian ini telah memenuhi "Declaration of Helsinki" dengan menunjukkan bahwa daun mimba dengan komponen imunomodulator (70-100 KDA) membangun keseimbangan baru melalui regulasi sistem imun yang hasilnya dapat kita kenali dari produk yang dihasilkan sel makrofag, dalam menghadapi stresor. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa komponen imunomodulator 70 KDA dan 100 KDA sama-sama meningkatkan aktivitas TNF- α dan fagositosis. Kelompok Kontrol (TNF- α) juga terlihat sel makrofag yang aktif, hal ini dapat dimengerti karena secara fisiologis sel makrofag akan mengekspresikan TNF- α . Sedangkan aktivitas fago-

sitosis tidak terdapat sel yang aktif, karena *C. albicans* tidak ditemukan secara normal di rongga mulut tikus.

TNF- α , aktivitas fagositosis dan jumlah koloni *C. albicans* menjadi solusi penting pada upaya pemecahan masalah ini, karena TNF- α , aktivitas fagositosis adalah komponen pada sistem imun *innate* yang bertugas sebagai sensor stimuli dari lingkungan, sedangkan jumlah koloni *C. albicans* digunakan sebagai parameter adanya efek perubahan komponen imun *innate* terhadap *C. albicans*. Komponen imunomodulator daun mimba mempengaruhi phosphatidilinositol pada membran sel makrofag dan akan mengaktifkan *protein Rac*, selanjutnya akan mengaktifkan *NF- κ B* dan *AP-1* melalui *jun kinase* melalui jalur *MAPK (The mito-gen-activated protein kinase)*. Termasuk jalur ini *ERK (Extracellular signal-regulated kinase)*, *JNK (c-jun N-terminal kinase)* dan *p38*. *ERK* mem-pengaruhi aktivitas *jun*, sedangkan *p38* mem-pe-ngaruhi produksi *IL-6*, *IL-8* dan *IL-12*. Aktivitas *p38* dan *ERK* dapat meng-aktifasi *AP-1*. Ketiga jalur *MAPK* dapat diaktifasi dalam waktu yang sama. *NF- κ B* merupakan regulator dari respons awal terhadap patogen dan sebagai aktivator respons imun. *NF- κ B* adalah *p50-p65* dari keluarga protein heterodimer yang mens-transkripsi bermacam gen. Aktivasi *NF- κ B* memerlukan fosforilasi protein *I κ B*, kemudian terjadi degradasi yang menyebabkan *p50-p65* berada dalam nukleus dan mengaktifkan gen. Setelah terjadi pelepasan *I- κ B*, akan terjadi peningkatan aktivitas faktor transkripsi *NF- κ B* yang menstimulasi ekspresi gen yang mempengaruhi produksi TNF- α dan aktivitas fagositosis. Stimulasi ekspresi gen antara lain mempengaruhi produksi TNF- α . Dalam respons imun terhadap *C. albicans*, TNF- α berperan sebagai imun primer dalam regulasi sistem imun. Khusus pada makrofag sitokin ini meningkatkan aktivitas dalam membunuh patogen, di mana aksi ini menjadi mediator penting pada inflamasi. Aktivitas respons imun *innate* ini dapat mempengaruhi *MHC*, sehingga akan berefek pada aktivitas imun adaptif (sel T dan sel B). Semua aktivitas ini dapat menurunkan jumlah koloni *C. albicans*.

Sebagai kesimpulan, komponen imunomodulator daun mimba dengan berat molekul 70 dan 100 KDA dapat meningkatkan aktivitas sel makrofag yang meliputi: ekspresi TNF- α dan aktivitas fagositosis serta menurunkan jumlah koloni *C. albicans*.

Daftar Pustaka

1. Agrawal D.P. Medical properties of Neem new findings. http://www.infinityfoundation.com/mandala/t_es/t_es_agraw_neem.htm. (3 Februari 2007).

2. Netea G. Mihai, Neil A.R. Gow, Carol A. Monro, Stevens Bates, et al. Immune sensing of *C. albicans* requires cooperative recognition of mannan and glucans by lectin and Toll-Like receptors. *J Clin Invest* 2006; 116: 1642-50.
3. Pivarcsi A, Laszlo B, Bence R, Anna K.s, Andrea K, Marta. Expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocyte. *International Immunology* 2003; 15: 6: 721-30.
4. Hanachi P, Fauziah O, Peng LT, Wei LC, Nam LL, Tian TS. The effect of *Azadirachta indica* on distribution of antioxidant elements and glutathione S-transferase activity in liver of rats during hepatocarcinogenesis. *Asia Pacific J Clin Nutr* 2004; 13(Suppl): S170.
5. Sithisam P, Subaphol R, Gritsanapan W. Antioxidant activity of Siamese neem tree. *J Ethnopharmacol* 2005; 13: 99(1): 109-12.
6. Subapriya Rajamanickam, Ramasamy K, Siddavaram N. Expression of PCNA, cytokeratin, Bcl-2, and p53 during chemoprevention of hamster buccal pouch by ethanolic neem leaf extract. *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 1080-87.
7. Widi R E, I Dewa Ayu R D. Penurunan ekspresi TNF- α makrofag pada tikus wistar yang diinokulasi *C. albicans*. *Stomatognathic J Kedokteran Gigi Universitas Jember* 2009; 6; 2: 141-4.
8. Ayu I D R. Ekspresi TLR4 makrofag pada tikus wistar yang diinokulasi *C. albicans*. *Stomatognathic J Kedokteran Gigi Universitas Jember* 2010; 7; 3: 29-34.
9. Ayu I D R. Aktivitas fagositosis pada tikus wistar yang diinokulasi *C. albicans* dan diberi mimba (*Azadirachta indica*). *Dentofasial J Kedokteran Gigi* 2011; 10; 1: 26-31.
10. Ganguli S. Neem: A Therapeutic for all Seasons. *Current Science* 2002; 82(11).
11. Goel RK, Sairam K. Anti ulcer drugs from indigenous source with emphasis on *Musa sapientum*, *tamrabhasma*, *asparagus racemosus* and *zingiber officinale*. *Indian J Pharmacology* 2002; 34: 100-10.
12. Arivazhagan, Balasenthil S, Nagini S. Garlic and neem leaf Extracts enhance hepatic glutathione and glutathione dependent enzyme during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanine (MNNG) induced gastric carcinogenesis in rats. *Phytother Res* 2002; 14(4): 291-3.
13. Biswas K, Ishita C, Ranajit KB, U Bandyopadhyay. Biological activities and medical properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* 2002; 82; 11, 10.
14. Helmy A. Wafaa, Hassan Amer and Nefisa M.A. El-Shayeb. Biological and antimicrobial activity of aqueous extracts from neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae). *Applied Sciences Res* 2007; 5(5): 1050-55.
15. Sukrasno. Mimba tanaman obat multifungsi, Jakarta: Agromedia Pustaka, 2003; 7-23.