

COMPARISON OF TOLL LIKE RECEPTOR 2 AND 4 MACROPHAGE EXPRESSION CAUSED BY NEEM LEAVES AQUEOUS EXTRACT IN ORAL CAVITY

(PERBANDINGAN TOLL-LIKE RECEPTOR 2 DAN 4
EKSPRESI MAKROFAG CAIRAN EKSTRAK DAUN NEEM
DALAM RONGGA MULUT)

I Dewa Ayu Ratna Dewanti

Departement of Biomedic,
Faculty of Dentistry Jember University
Kalimantan street 37, Jember; email: dewadewanti@yahoo.com.
Telp. 0331-333536. Fax. 331991. HP. 081249450970

Abstract

Neem is one of the traditional medicine trees known by society and has function as immunomodulatory. TLR2 and TLR4 played an important role in recognition of infection. This experimental study aimed to know the comparison of TLR2 with TLR4 macrophage expression of Aqueous extract from neem (*Azadirachta indica*) leaves in oral cavity. The subjects of this research were 24 male-wistar rats divided into five groups: Control Group (ko) had no treatment. Group II was fed with 50 mg/day/kg body weight aqueous extracts from neem leaves (KP1), group III was fed with 100 mg/day/kg body weight aqueous extract from neem leaves (KP2), group IV was fed with 200 mg/day/kg body weight aqueous extract from neem leaves (KP3). After 21 days, rats would be killed and cut there tongues and analized by imunohistochemy. Data obtained will be analyzed using Anova and followed by HSD and linier regression. The result showed that there was no significant different ($p < 0,05$) between comparison of TLR2 with TLR4 macrophage expression of experimental groups V. There was significant difference in the increasing of TLR2 and TLR4 between KO with KP. As conclusion, there was increasing of TLR2 and TLR4 macrophage expression of aqueous extract from neem leaves in oral cavity, but there was no significant difference.

Key words: *Candida albicans*, toll like receptor 2, toll like receptor 4, macrophage

PENDAHULUAN

Mimba (*Azadirachta Indica*) telah dikenal dan dimanfaatkan masyarakat untuk mengatasi berbagai macam penyakit, seperti: cacangan, kudis, malaria, infeksi jamur, mengatasi tumor dan alergi.^{1,2} Daun mimba dengan kandungan antara lain *catechin*, *epicatechin*, *galic acid* diduga dapat memodulasi respons imun terhadap patogen. Komponen imunomodulator dengan cepat diabsorbsi oleh membran usus dan diedarkan dalam darah setelah 45 menit diberikan secara per oral dengan *half-life* dalam plasma 5 jam, cepat diabsorbsi ke dalam semua jaringan tubuh dan sistem organ.^{3,4} Penulis membuktikan perasan daun mimba dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* secara *in vitro*,⁵ efek ekstrak cair daun mimba terhadap peningkatan fagositosis makrofag pada tikus yang diinokulasi *C. albicans*, isolasi komponen imunomodulator daun mimba. Beberapa

peneliti juga telah membuktikan mimba dapat memodulasi imunitas alami dan adaptif, yang mana imunitas alami merupakan imunitas terdepan yang melawan patogen dan diperankan oleh makrofag. Makrofag berperan penting dalam melawan infeksi oleh mikroorganisme.^{6,7} Makrofag sebagai fagosit profesional mengenali dan menghancurkan bakteri patogen, melalui beberapa reseptor merangsang produksi substansi mikrobial melalui CD14 yang diekspresikan ke permukaan sel dan akan mengaktifkan *Toll-like receptors* (TLRs) serta *Nuclear Factor-κB* (NF-κB).^{8,9} Stimulasi sitokin proinflamatori dan aktivasi *innate immunity* tergantung pada keakuratan pengenalan patogen. Diduga TLR2 dan TLR4 berperan pada perlekatan patogen pada fagosit, sehingga dikatakan TLR2 dan TLR4 merupakan kunci mediator pada imunitas alami terhadap jamur, namun belum diketahui apakah memang TLR ini berperan dan yang mana dari keduanya yang lebih

berperan.^{10,11} Penurunan NF- κ B, TLR2 dan TLR4 akan menghambat aktivitas fagositosis, sehingga dikatakan TLRs merupakan mediator kunci imunitas alami.^{12,13} Pada imunitas alami, patogen dikenali TLR, menimbulkan sinyal dalam sel dan mempengaruhi ekspresi sitokin. Reseptor sitokin dan TLR akan mengaktifasi faktor transkripsi gen dan sintesis protein yang memperantarai fungsi efektor makrofag seperti pembunuhan mikroba, trombosis, *tissue remodelling*, inflamasi dan peningkatan presentasi antigen.^{14,15}

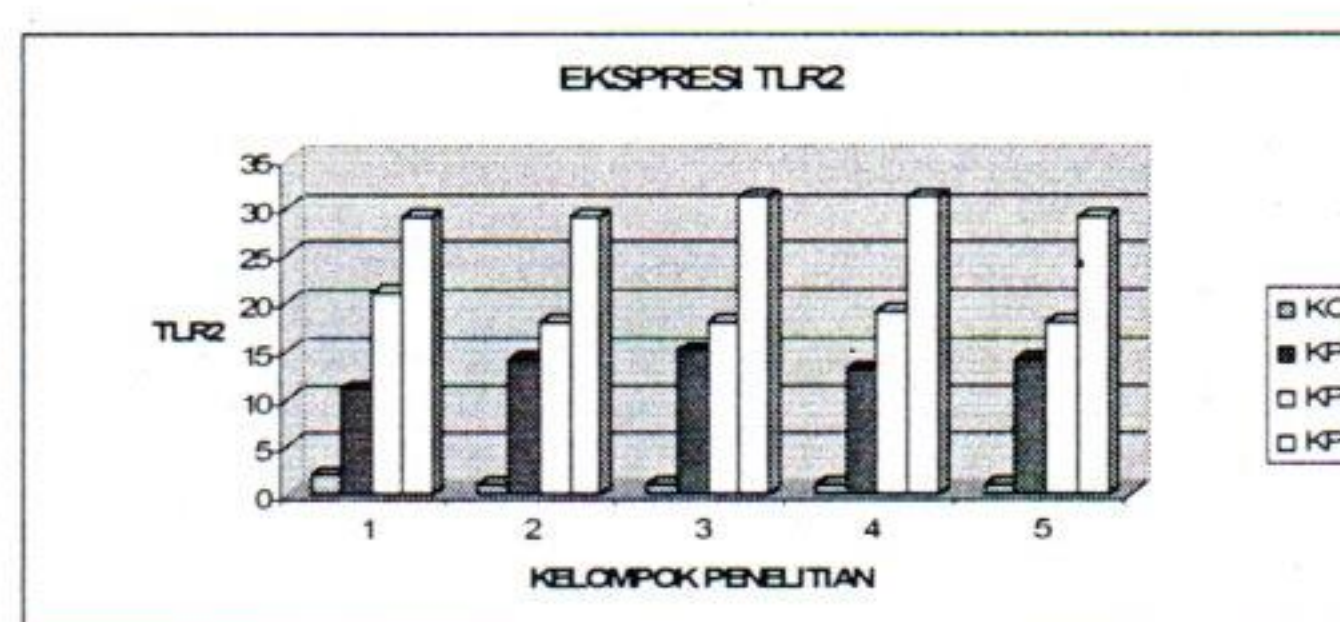
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan ekspresi TLR2 dengan TLR4 makrofag pada tikus wistar yang diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba (*Azadirachta indica*).

BAHAN DAN METODE

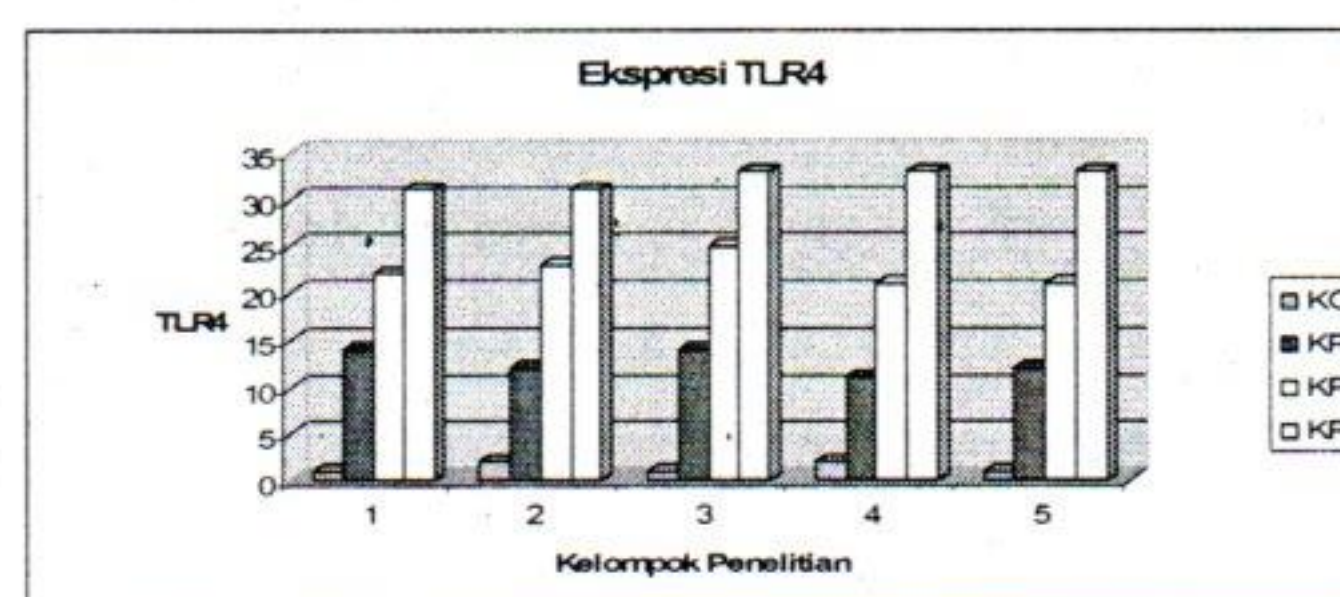
Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium. Jumlah sampel 24 ekor tikus Wistar jantan, yang memenuhi "Declaration of Helsinki" dengan perhitungan: $(t - 1)(r - 1) \geq 15 \rightarrow (5 - 1)(r - 1) \geq 15$ (t = jumlah kelompok, r = jumlah ulangan), sehingga masing-masing kelompok 6 ekor. Berat tikus 100-200 gr, usia 2-3 bulan adaptasi 1 minggu. Terdapat 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (KO): tidak diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba, kelompok perlakuan yang terdiri atas: KP1: kelompok yang diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba dosis 50 mg/hari/kg berat badan, KP2: kelompok yang diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba dosis 100 mg/hari/kg berat badan dan KP3: kelompok yang diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba dosis 200 mg/hari/kg berat badan. Masing-masing kelompok dilakukan pengamatan pada hari ke 22 tikus dikorbankan dan dilakukan pengambilan jaringan lidah tikus untuk dibuat sediaan, kemudian dilakukan analisis TLR2 dan TLR4 dengan metode imunohistokimia, yaitu: dilakukan deparanisasi menggunakan *xylol*, *xylol* dihilangkan dengan etanol mulai absolut sampai 70%, air, dan PBS (*phosphate buffer saline*) pH 7,4 dan diberi tripsin 0,0 25%. Preparat digenangi larutan H_2O_2 3%, dicuci dengan PBS 2x dan dilakukan proses bloking dengan BSA 3%. *Anti mouse* TLR2 dan TLR4 direaksikan, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C dalam *humidity chamber*. Kemudian direaksikan dengan *biotinylized secondary Ab* (*anti rabbit*). Dicuci 3x dengan PBS, dan ditambahkan streptavidin berlabel peroksidase dan diinkubasi selama 1 jam. Dilakukan pencucian kembali dengan dengan PBS 3x, direaksikan dengan substrat DAB (*diamine benzidine*), kemudian ditambahkan "Meyer-HE". Data yang diperoleh dianalisis dengan Anova dan dilanjutkan Uji HSD.

HASIL

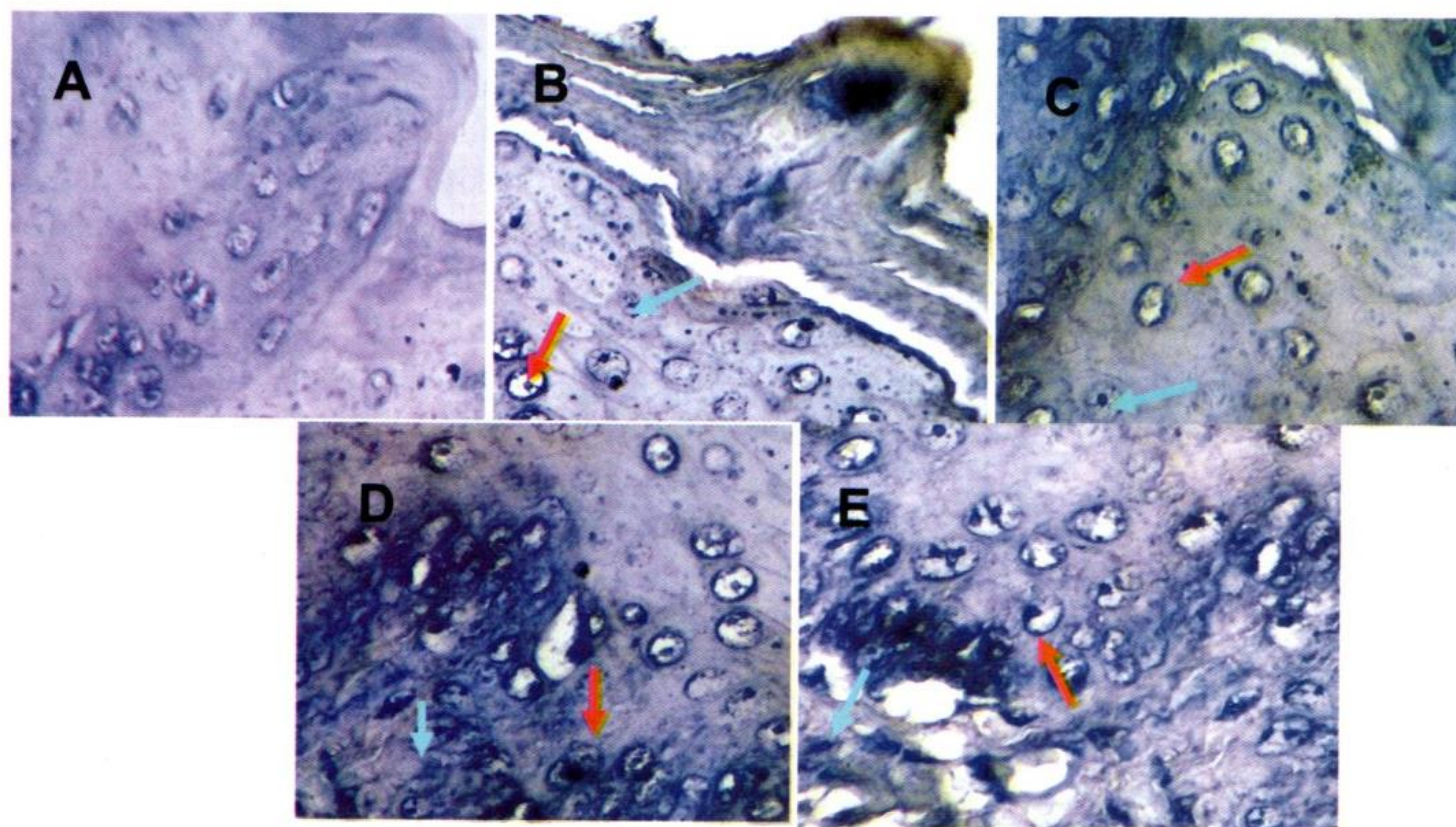
Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak cair daun mimba dapat meningkatkan ekspresi TLR2 dan TLR4 makrofag. Pada Gambar 3 dan 4, dari kelompok B sampai E terlihat sel-sel makrofag yang mengekspresikan TLR2 dan TLR4 (biru tua) semakin bertambah banyak. Di mana semakin tinggi dosis mimba yang diberikan, semakin banyak sel makrofag yang mengekspresikan TLR2 dan TLR4. Hal ini juga dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2 menunjukkan grafik batang kelompok perlakuan lebih tinggi dibanding kontrol dan dengan semakin tinggi dosis mimba, grafik batang juga semakin tinggi. Gambar 5 menunjukkan grafik batang perbandingan TLR2 dengan TLR4, pada KP2 (dosis 50 mg/BB) TLR4 lebih rendah dari TLR2, sedangkan KP3 (100 mg/BB) dan KP4 (200 mg/BB) TLR4 menunjukkan batang yang lebih tinggi. Namun demikian, batang TLR2 maupun TLR4 terlihat hampir sama tingginya, dan secara statistik perbandingannya tidak bermakna. Ini menunjukkan bahwa peningkatan TLR2 dan TLR4 akibat ekstrak cair daun mimba setara. Untuk mengatasi patogen yang dominan dikenali oleh TLR4, kita dapat menggunakan ekstrak cair daun mimba dengan dosis 100 mg/BB atau 200 mg/BB, sebaliknya untuk bakteri patogen yang dominan TLR2 digunakan dosis 50 mg/BB. Setelah dilakukan analisa statistik dengan Anova yang dilanjutkan Uji HSD menunjukkan terjadi peningkatan TLR2 dan TLR4 yang signifikan jika dibandingkan kontrol, sedangkan perbandingan TLR2 dengan TLR4 terdapat perbedaan tidak bermakna.



Gambar 1. Perbandingan ekspresi TLR2 antara kontrol dengan ekstrak cair daun mimba



Gambar 2. Perbandingan ekspresi TLR4 antara kontrol dengan ekstrak cair daun mimba



Gambar 3. Ekspresi TLR2 makrofag dengan teknik imunohistokimia (pembesaran 400x)

Warna biru tua pada membran sel terdapat ekspresi TLR2 (→)

Warna biru muda pada membran sel menunjukkan tidak ada ekspresi TLR2 (→)

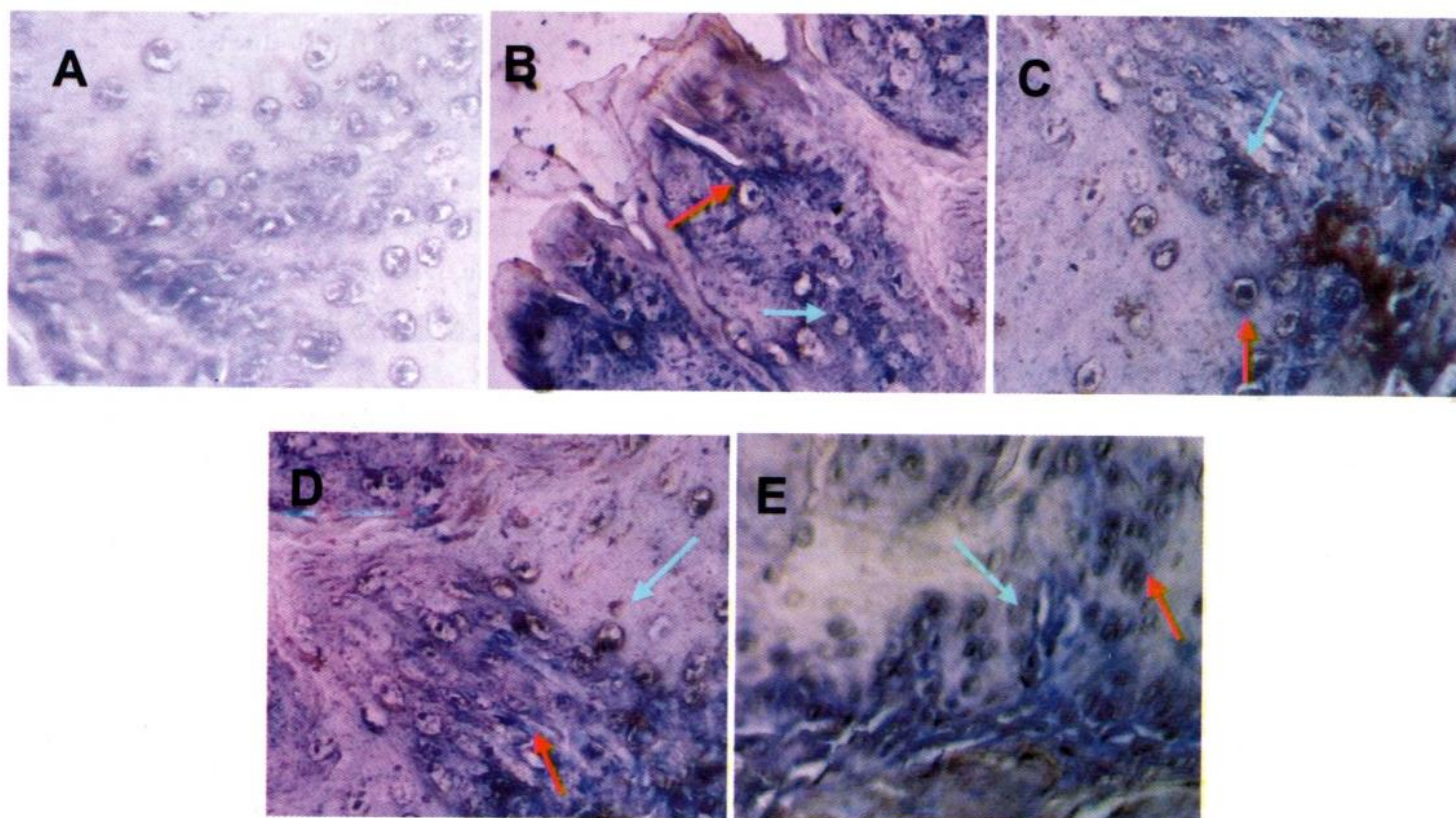
A. Kontrol pengecatan

B. Ekspresi TLR2 pada makrofag kelompok Kontrol (KO)

C. Ekspresi TLR2 pada makrofag kelompok Perlakuan 1 (KP1)

D. Ekspresi TLR2 pada makrofag kelompok Perlakuan 2 (KP2)

E. Ekspresi TLR2 pada makrofag kelompok Perlakuan 3 (KP3)



Gambar 4. Ekspresi TLR4 makrofag dengan teknik imunohistokimia (pembesaran 400 x)

Warna coklat pada membran sel terdapat ekspresi TLR4 (→)

Warna biru pada membran sel menunjukkan tidak ada ekspresi TLR4 (→)

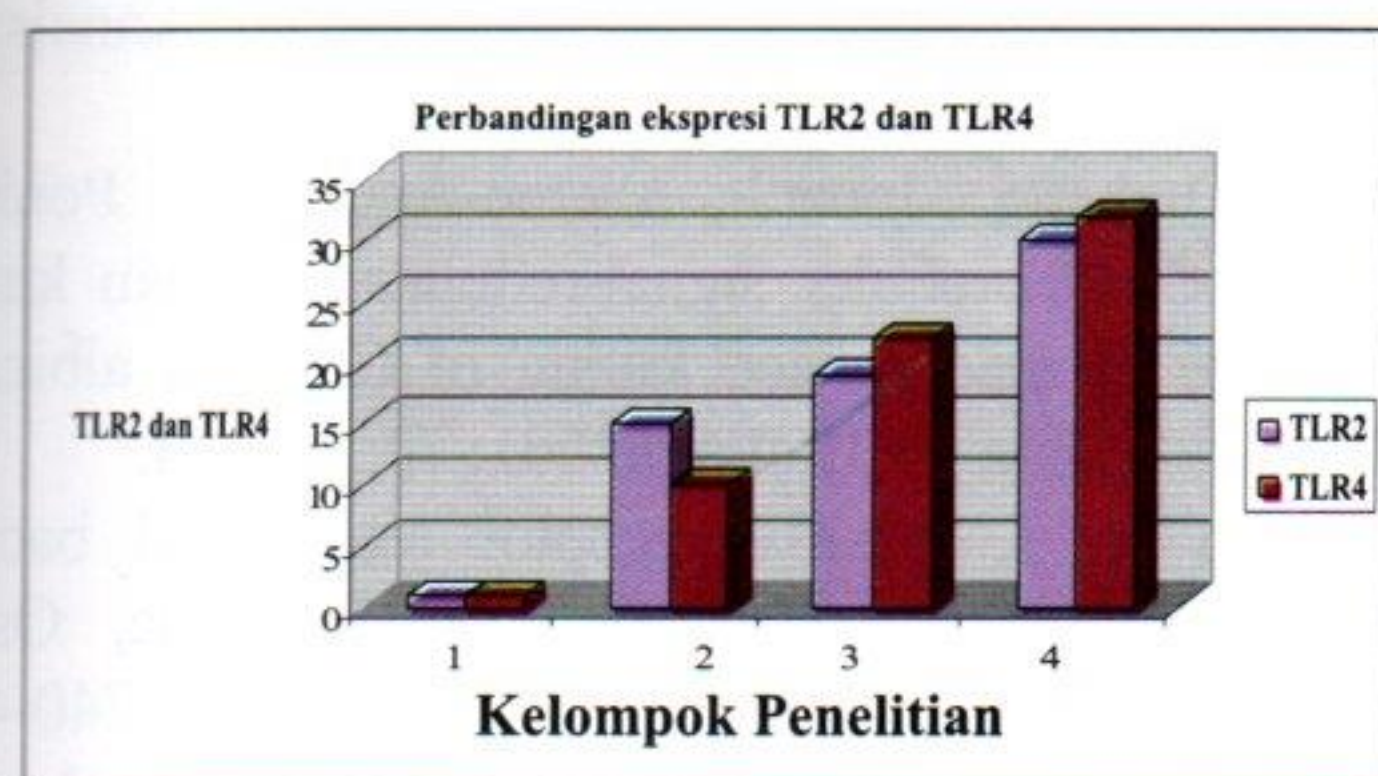
A. Kontrol pengecatan

B. Ekspresi TLR4 pada makrofag kelompok Kontrol (KO)

C. Ekspresi TLR4 pada makrofag kelompok Perlakuan 1 (KP1)

D. Ekspresi TLR4 pada makrofag kelompok Perlakuan 2 (KP2)

E. Ekspresi TLR4 pada makrofag kelompok Perlakuan 3 (KP3)

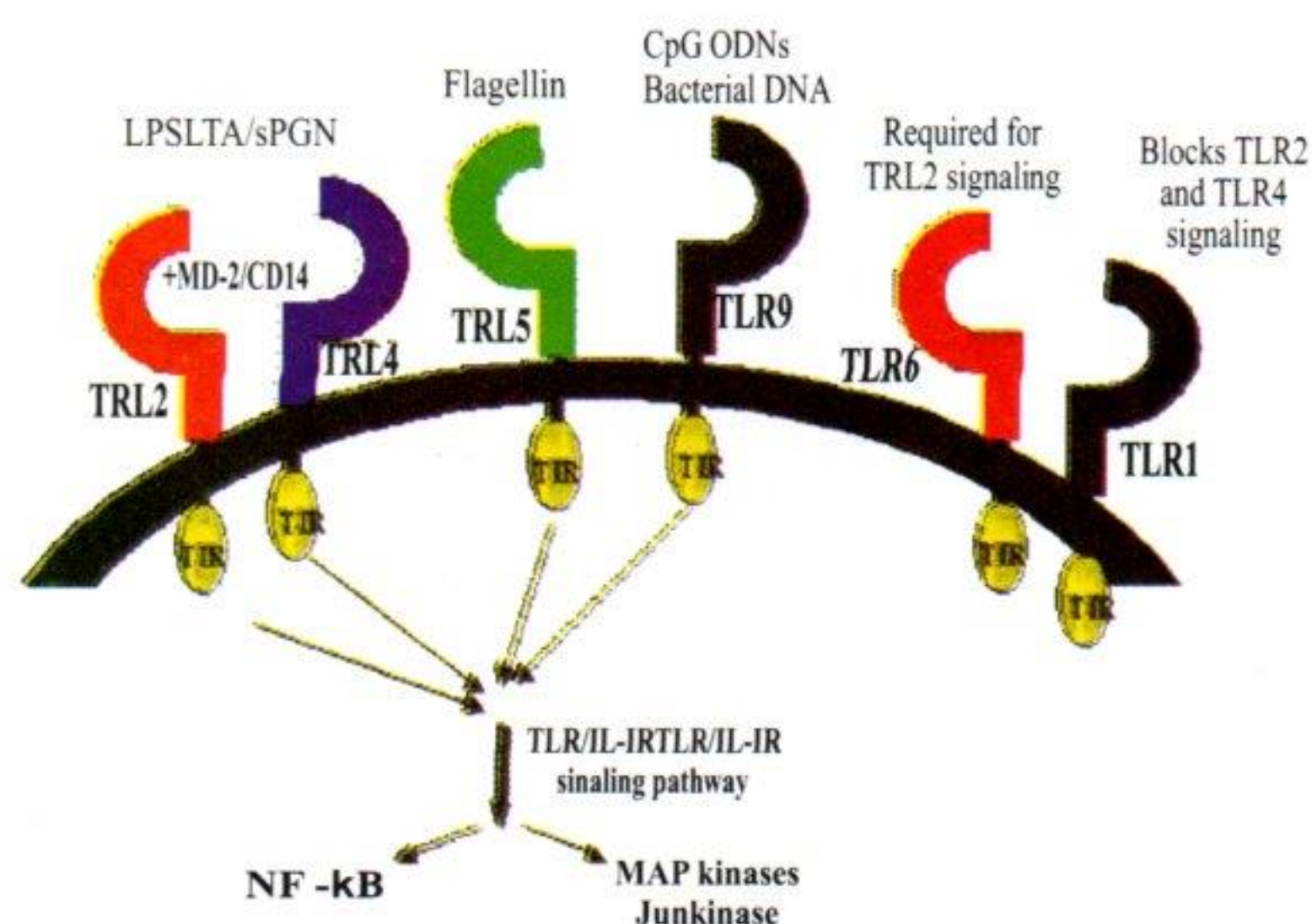


Gambar 5. Perbandingan ekspresi TLR2 dengan TLR4

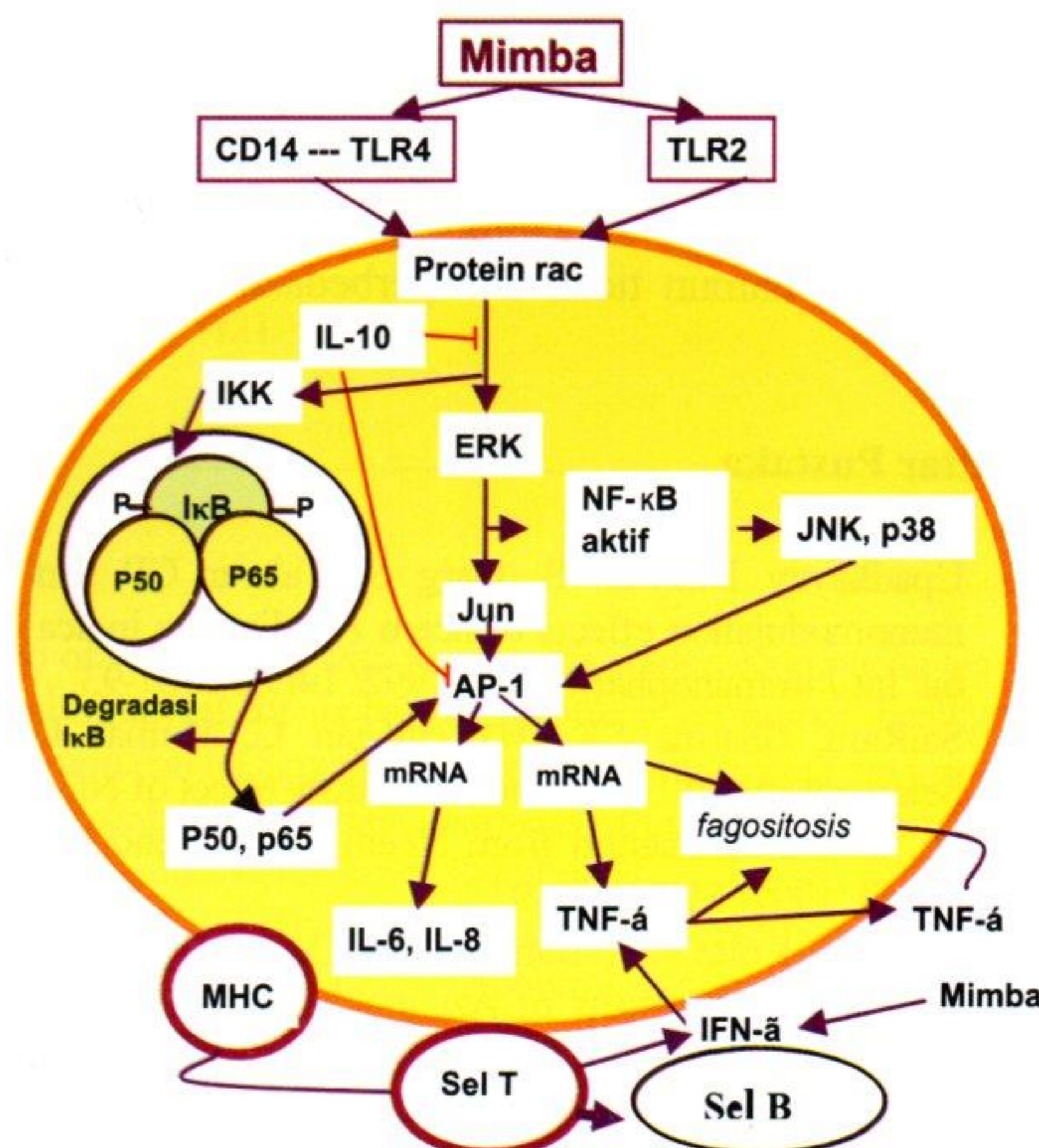
PEMBAHASAN

Ekstrak cair daun mimba terbukti dapat meningkatkan ekspresi TLR2 dan TLR4 makrofag. Hal ini diduga oleh karena kandungan komponen imunomodulator daun mimba, seperti: *Galic acid*, *epicatechin*, *catechin* yang dapat merubah sinyal makrofag terhadap patogen. Peningkatan ini akan mempengaruhi aktivitas di dalam sel makrofag dalam menanggapi adanya patogen. Dengan sendirinya perlawanan makrofag terhadap patogen semakin meningkat.

TLRs merupakan protein homologous pada membran sel APC yang berfungsi sebagai reseptor fungsional yang mengaktifkan leukosit untuk menimbulkan mentrigger respons imun *innate* atau respons inflamatori dalam melawan patogen. Protein ini ditemukan pertama kali pada *Drosophila* sebagai protein Toll. Reseptor ini terdiri atas daerah yang kaya dengan *leucine* pada ekstrasel dan pada region ekor sitoplasma yang merupakan reseptor dari IL-1 dan IL-8 dan disebut Toll/IL-1 reseptor (TIR) domain Reseptor untuk pengenalan terhadap patogen dan produk mikroba akan menimbulkan imunitas *innate*. Fungsi tersebut dihubungkan dengan reseptor kinase yang kemudian menstimulasi produksi sitokin dan substansi mikrobisidal (Gambar 6).

Gambar 6. Pengenalan patogen oleh TLR¹⁷

aktifkan NF-κB MAP kinases melalui Jun kinases. TLR2 mengenali mikroba melalui lipopeptida, TLR1, TLR6 bekerjasama dengan TLR2 untuk membedakan *triacyl* dan *diacyl* lipopeptida. TLR4 merupakan reseptor terhadap LPS, mannan. TLR9 spesifik pada pengenalan CpG DNA. TLR3 untuk pengenalan dsRNA virus, sedangkan TLR7 dan TLR8 dikhususkan pada pengenalan flagela.

Gambar 7. Skema efek ekstrak cair daun mimba terhadap sistem imun⁵

Peningkatan aktivitas TLR2, TLR4 akibat ekstrak cair daun mimba akan mempengaruhi fosfatidilinositol pada membran sel makrofag dan akan mengaktifkan protein Rac, selanjutnya akan mengaktifasi NF-κB dan AP-1 melalui jun kinase melalui jalur MAPK (*The mitogen-activated protein kinase*). Termasuk jalur ini ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-jun N-terminal kinase*) dan p38. ERK mempengaruhi aktivitas jun, sedangkan p38 mempengaruhi produksi IL-6, IL-8 dan IL-12. Aktivitas p38 dan ERK dapat mengaktifasi AP-1. Ketika jalur MAPK dapat diaktivasi dalam waktu yang sama. NF-κB merupakan regulator dari respons wal terhadap patogen dan sebagai aktivator respons imun. NF-κB adalah p50-p65 dari keluarga protein heterodimer yang menstranskripsi bermacam gen. Aktivasi NF-κB memerlukan fosforilasi protein IκB, kemudian terjadi degradasi yang menyebabkan p50-p65 berada dalam nukleus dan mengaktifkan bermacam-macam gen. Setelah terjadi pelepasan I-κB, maka terjadi peningkatan aktivitas faktor transkripsi NF-κB yang menstimulasi ekspresi gen yang mempengaruhi produksi TNF-α dan aktivitas fagositosis. Khusus pada makrofag sitokin ini meningkatkan aktivitas dalam membunuh pato-

Komponen mikroba yang telah dikenali dan terikat pada CD14, TLR melalui MD-2, TIR/IL-1R akan meng-

gen, di mana aksi ini menjadi mediator penting pada inflamasi. TNF- α , IL-6 menginduksi proliferasi neutrofil selama inflamasi, apoptosis, deferensiasi, deferensiasi, tumorigenesis, replikasi virus. TNF- α , IL-6 ini diproduksi secara kontinyu oleh sel untuk homeostasis dan akan meningkat dengan tujuan *remodeling* atau *replacement* dari injuri, yang berkaitan dengan penyakit inflamatori atau. Selanjutnya efek aktivitas ini akan menstimulasi juga respons adaptif (Gambar 7).

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak cair daun mimba meningkatkan ekspresi TLR2 dan TLR4, namun tidak ada perbedaan yang bermakna.

Daftar Pustaka

1. Upadhyay Dhawan S, Garg S, Talwar GP. Immunomodulation effects of neem *Azadirachta indica* oil. *Int J immunopharmacol*; 1992; 14(7): 1187-93.
2. SaiRam, Sharma SK, Havazhagan G, Kumar D, Selavamurthy W., Immunomodulatory effect of NIM-76, a volatile fraction from Neem oil. *J Ethnopharmacol*. 1997; 55(2): 133-9.
3. Sadekar, Kolte AY, Barnase BS, Desai VF, Immunopotentiating effects of *Azadirachta indica* (Neem) dry leaves powder in broilers, naturally infected with IBD virus. *Indian J Exp Biol*, 1998; 36(11): 1151-3.
4. Helmy A. Wafaa, Hassan Amer and Nefisa M.A. El-Shayeb NMA, Biological and antimicrobial activity of aqueous extracts from neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae). *Journal of Applied Sciences Research*, 2007; 3(10): 1050-55.
5. Dewanti. Daya hambat pertumbuhan *C albicans* oleh perasan daun mimba (*Azadirachta Indica juss*), *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*, Edisi khusus Temu Ilmiah Nasional III 6-9 Agustus. 200: 342-44.
6. Husr Nigel P, Molecular basis of activation and regulation of the phagocyte respiratory burst. *Annals of Rheumatic Diseases* 1987; 46: 265-72.
7. Stela-Ombetta, Jouault, Pierree-Andre T, Poulain. Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*. *Journal Leukocyte Biology* 2001; 70: 149-54.
8. Shizuo A. A toll-like receptor recognized bacteri. Research Institute for Microbial Disease, Osaka University; Erato of Japan, *Nature* 2000: 408,740-45
9. Blasi E. Mucci A. Neglia R. Pezzini F. Colombari B. Radzioch D. Cossa-rizza, Biological importance of the two toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2005: 44(1); 69-79.
10. Andre F, Tannette G. Krediet, innate immunity: toll-like receptors and some more. *Neonatology*, 2007: 92: 145-57.
11. Liew FY, Xu D, Brint EK, Luke AA. O'Neill J, Negative regulation of Toll-Like receptor-mediated immune response. *Nature Review Immunology*, 2005: 5: 446-58.
12. Mihai NG, Van der Graaf C, Verschueren, Van der Meer J, Kullberg BJ, The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR 4 in the host defense against disseminated Candidiasis. *The Journal of infectious disease* 2002; 185: 1483-89.
13. Norimitsu K. Subset of human dendritic cell precursor express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal Experimental Medicine* 2001; 194: (6): 863-70.
14. Morihito S. Direct binding of Toll-Like Receptors 2 to Zymosan and TNF α Secretion Are Down-Regulated by Lung Collectin Surfactant Protein A. *The Journal of Immunology*, 2003: 171: 417-25.
15. Mihai NG. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannan and glucans by lectin and toll-like receptors. *J Clin Invest* 2006; 116: 1642-50.