Minyak Atsiri Temu Putih (*Curcuma Zedoaria* Rosc., Zingiberaceae) Menurunkan Ekspresi $CD4^+$ Pada Gingiva Terpapar *A. Actinomycetemcomitans*

Juni Handajani

Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada
Jl Denta No 1 Sekip Utara, Yogyakarta, email: junihandajani@yahoo.com

ABSTRAK

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A. actinomycetemcomitans*) merupakan bakteri Gram-negatif yang dikaitkan dengan penyakit periodontal. Ekspresi positif $CD4^+$ tampak pada keadaan gingivitis (inflamasi gingiva) maupun periodontitis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) terhadap ekspresi $CD4^+$ pada gingiva terpapar *A.actinomycetemcomitans*. Penelitian dilakukan pada tikus Wistar jantan umur 3 bulan yang diberi paparan bakteri *A.actinomycetemcomitans* pada gingiva anterior mandibula. Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor tikus diberikan minum minyak atsiri temu putih dosis 30,6µl/ml selama 14 hari dan kontrol diberikan aquades. Bakteri diaplikasikan sebanyak 100 µl hari ke-7 sampai ke-14 lalu hari ke-15 dilakukan pengorbanan tikus teranestesi. Gingiva anterior mandibula tikus diambil untuk pembuatan preparat histologis selanjutnya dilakukan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) dan imunohistokimia. Antibodi $CD4^+$ (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) digunakan pada pewarnaan imunohistokimia. Pengamatan preparat histologis menggunakan mikroskop cahaya. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi $CD4^+$ positif kuat di lamina propria dan stratum basale pada kelompok kontrol sedangkan ekspresi positif lemah di area lamina propria tampak pada kelompok perlakuan. Disimpulkan bahwa induksi minyak atsiri temu putih dapat menurunkan inflamasi gingiva ditandai dengan penurunan ekspresi $CD4^+$.
Maj Ked Gi. Juni 2013; 20(1): 9 - 13

Kata kunci: *temu putih (Curcuma zedoaria Rosc.), minyak atsiri, ekspresi $CD4^+$, gingiva, Aggregatibacter actinomycetemcomitans.*

ABSTRACT: **Reducing $CD4^+$ Expression at Gingiva Exposed *A. Actinomycetemcomitans* using *Curcuma Zedoaria Rosc.*, Zingiberaceae.** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans) is a gram-negative bacteria associated with periodontal disease. Positive expression of $CD4^+$ is shown in gingivitis and periodontitis. The aim of this study was to determine the effect of curcuma zedoaria Rosc., volatile oil against $CD4^+$ expression on gingiva exposed A. actinomycetemcomitans. The study was conducted on male Wistar rats aged 3 months that were exposed bacteria A. Actinomycetemcomitans. Treatment group as many as 5 rats were administered orally with curcuma zedoaria Rosc. volatile oil at dose of 30.6 µl/ml for 14 days and distilled water in control. A 100 µl bacteria were applied on the 7^{th} to 14^{th} day on the gingiva anterior mandibular. At the 15^{th} day, rat was anesthetized then sacrificed. The mandibular gingiva anterior of the rat was taken as histological preparations for HE and immuno-histo chemical staining. $CD4^+$ antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA) was used for immune staining. Histological preparations were observed under a light microscope.The results showed a strong positive $CD4^+$ expression in the lamina propria and stratum basale of control group while a weak positive expression in lamina propria area of treatment group. From the experiment, it is concluded that the induction of curcuma zedoaria Rosc. volatile oil may reduce gingivitis, indicated by the decrease in $CD4^+$ expression.*
Maj Ked Gi. Juni 2013; 20(1): 9 - 13.

Keywords: *Curcuma zedoaria Rosc., volatile oil, $CD4^+$ expression, gingiva, Aggregatibacter actinomycetemcomitans.*

PENDAHULUAN

Temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) secara empiris digunakan oleh masya-rakat Indonesia sebagai stomatikum, karminativum, tonikum, penawar gigitan ular, pengobatan luka dan ulcer. Minyak atsiri temu putih berupa cairan kental kuning emas mengandung senyawa seskuiterpen berupa kurkumin dan derivat-derivatnya. Kandungan lain dalam minyak atsiri rimpang temu putih antara lain 1) monoterpen hidrokarbon (a-pinen, D -kamfen), monoterpen alkohol (D-borneol), monoterpen

keton (D-kamfor), monoterpenoksida dan sineol, dan 2) seskuiterpen golongan: bisabolan, eleman, germakran, eudesman, guaian dan spirolakton.[1,2] Efek anti inflamasi temu putih diketahui karena kandungan *furanodiene* dan *furanodienone*.[2]

Aggregatibacter actinomycetemcomitans atau *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) diketahui sebagai *secondary colonizers* yang berperan pada terbentuknya plak gigi sub gingiva. Bakteri *A. actinomycetemcomitans* termasuk Gram-negatif fakultatif non-motil berbentuk batang dan sebagai bakteri komensal di rongga mulut. Bakteri ini sering ditemukan pada plak gigi, poket gingiva maupun sulkus gingiva pada keadaan *localized aggressive periodontitis* (*localized juvenile periodontitis)* maupun periodontitis kronis. Faktor virulensi bakteri *A. actinomycetemcomitans* antara lain *host tissue invasion*, *leukotoxin*, kolagenase, *endotoxin (LPS)*, *epitheliotoxin*, *fibroblast inhibiting factor* dan *bone resorption-inducing factor*.[3]

Bakteri *A. actinomycetemcomitans* dapat ditemukan pada keadaan periodontitis (komposisinya sekitar lebih dari 90%) dengan dikarakterisasi adanya kehilangan tulang alveolar dan terbentuknya poket gingiva. Kolagenase bakteri *A. Actinomycetem-comitans* diketahui juga terlibat dalam degradasi kolagen pada keadaan gingivitis.[4] *Leukotoxin A. actinomycetemcomitans* mempunyai efek sitolitik terhadap sejumlah sel antara lain sel polimorfonuklear (PMN), makrofag dan fibroblas.[5] Faktor virulensi *leukotoxin* tersebut diduga berkaitan dengan keparahan penyakit periodontal melalui perusakan mekanisme pertahanan lokal.[4] Bakteri *A. actinomycetemcomitans* juga memproduksi protein yang mampu menghambat kemotaksis leukosit dan produksi H_2O_2.[6]

*Cluster of differentiation*4 (CD4) adalah glikoprotein yang ditemukan pada permukaan sel imun seperti sel T *helper* (Th), monosit, makrofag dan sel dendritik. $CD4^+$ sebagai sel darah putih yang berperan penting pada sistem imunitas manusia. $CD4^+$ juga memiliki peran utama untuk mengirim sinyal ke sel imun lainnya seperti $CD8^+$. Fujihashi *et al.*[7] telah mengisolasi sel $CD4^+$ dari jaringan gingiva yang mengalami inflamasi dan tampak adanya 2 profil yaitu Th1 dan Th2, kedua profil tersebut positif terhadap IFN-γ, IL-6 dan IL-13 mRNA. Sel Th1 dihubungkan dengan lesi stabil sedangkan respon Th2 dihubungkan dengan penyakit progresif. Hasil penelitian tersebut juga mengemukakan bahwa pada keadaan gingivitis berhubungan dengan respon Th1, sedangkan pada periodontitis berhubungan dengan respon Th2. Jumlah sel $CD4^+$ hanya sedikit pada gingiva yang mengalami penyembuhan atau gingiva tanpa kelainan serta dapat meningkat pada keadaan gingivitis.[8]

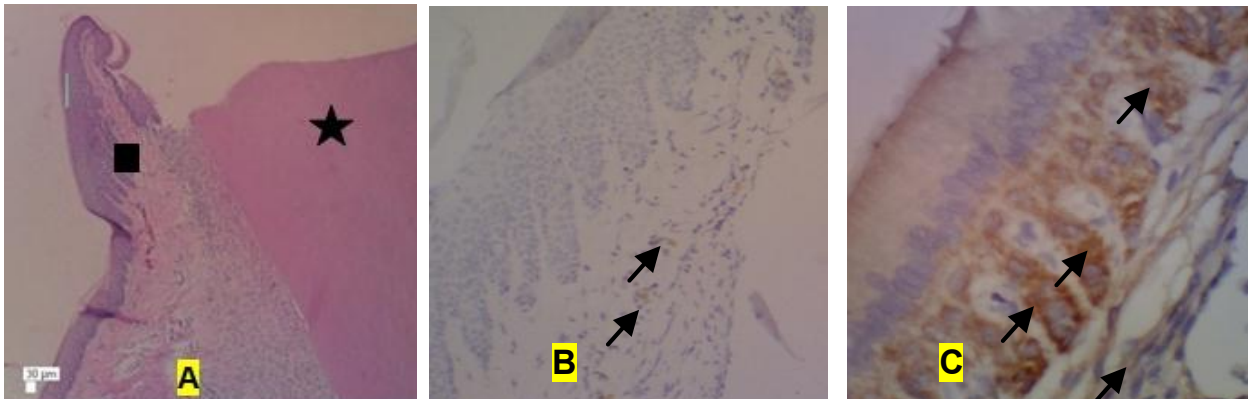
Permasalahannya adalah bagaimana efek minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoaria*Rosc.) terhadap ekspresi $CD4^+$ pada gingiva terpapar *A.actinomycetemcomitans*?. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberi informasi mengenai pemberian minum minyak atsiri terhadap peningkatan respon imun tubuh melalui ekspresi $CD4^+$ pada gingiva yang terpapar bakteri *A. actinomycetemcomitans*.

METODE PENELITIAN

Tanaman temu putih telah dideterminasi di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM (No. BF/189/Ident/Det/VI/2012) dengan hasil *Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe. Destilasi minyak atsiri temu putih dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Destilasi dari rimpang temu putih seberat 2833 gram menghasilkan 3 ml minyak atsiri konsentrasi 100%. Penelitian eksperimental murni ini telah mendapat persetujuan dari Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (No.301/KKEP/FKG-UGM/EC/2012).

Penelitian dilakukan pada 10 ekor tikus Wistar jenis kelamin jantan usia 3 bulan dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan dan kontrol (@ 5 ekor). Kelompok perlakuan diberi minum minyak atsiri temu putih dosis 30,6 μl/ml dan kontrol diberi minum aquabides. Pemberian minum minyak atsiri dan aquabides sesuai kelompok perlakuan sebanyak 1 ml selama 14 hari. Bakteri *A. actinomycetemcomitans* sebanyak 100 μl dalam CMC 2% dioleskan pada gingiva anterior rahang bawah pada hari ke-7 pada kelompok perlakuan dan kontrol. Pengolesan bakteri tersebut dilakukan sehari satu kali selama 7 hari. Pada hari ke-15 hewan coba dianestesi menggunakan Ketamin hidroklorida 10% (Ketamil®) dosis 100 mg/

Gambar 1. Gambaran klinis hari ke-14 tampak gingivitis pada kelompok kontrol (A) sedangkan gingiva sehat pada kelompok perlakuan setelah pemberian minum minyak atsiri temu putih (B). Keadaan gingiva ditunjukkan dengan tanda panah.



Gambar 2. Pengamatan histologis tampak gingiva normal pada kelompok perlakuan dengan pewarnaan HE (A). Ekspresi $CD4^+$ positif lemah tampak pada lamina propria kelompok perlakuan (B). Kelompok kontrol (C) menunjukkan ekspresi $CD4^+$ positif kuat di stratum basale dan lamina propria. Ekspresi $CD4^+$ (➶), gingiva(■) dan gigi (★).

kg berat badan secara *intramuscular* lalu dikorbankan. Jaringan gingiva anterior rahang bawah diambil untuk pembuatan preparat histologis. Fiksasi jaringan menggunakan larutan buffer formalin 10% selama 24 jam lalu dekalsifikasi menggunakan EDTA 10%. Pewarnaan imunohistokimia menggunakan metode Avidin Biotin untuk mendeteksi ekspresi $CD4^+$ (*Santa Cruz Biotechnology*, *USA*). Prosedur pewarnaan imunohistokimia dilakukan menurut menurut petunjuk pabrik *ABC Staining System Kit* (*Santa Cruz Biotechnology*, *California*). Pengamatan hasil pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) dan ekspresi $CD4^+$ menggunakan mikroskop cahaya di Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

HASIL

Gambaran klinis gingiva tikus hari ke-14 pada kelompok perlakuan dan kontrol ditampilkan pada Gambar 1. Hasil penelitian tampak gingiva kelompok kontrol masih terlihat terjadi gingivitis sedangkan pada kelompok perlakuan terlihat gingiva sehat.

Hasil pewarnaan hematoksilin eosin (HE) dan imunohistokimia ekspresi $CD4^+$ ditampilkan pada Gambar 2.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan paparan bakteri *A. actinomycetemcomitans* selama 7 hari pada gingiva tikus mampu menginduksi terjadinya inflamasi pada kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok perlakuan yang diberi minum minyak atsiri temu putih sejak 7 hari sebelum paparan bakteri menunjukkan tidak tampak terjadinya gingivitis. Hasil ini didukung oleh penelitian Müller *et al*.[9] bahwa bakteri *A. actinomycetemcomitans* ditemukan pada subjek penderita gingivitis. Pada penelitian tersebut menyebutkan lebih dari 20% area plak subgingiva dari subjek gingivitis mengandung bakteri *A. actinomycetemcomitans*.

Hasil penelitian ini menunjukkan ekspresi $CD4^+$ positif di jaringan gingiva kontrol maupun perlakuan. Hasil ini sesuai hasil penelitian sebelumnya bahwa antigen $CD4^+$ dapat diekspresikan oleh sel Langerhans epidermal maupun gingiva.[10-12] Molekul CD4 juga diketahui sebagai reseptor untuk antigen *non-polymorphic major histocompatibility complex* (MHC) Class II.[13] Hal ini memungkinkan molekul CD4 mempengaruhi fungsi imun *dependent* MHC *Class* II dari sel Langerhans.[14,15]

Sel $CD4^+$ diketahui sebagai sel T *helper* (Th). Sel Th dapat diklasifikasikan menjadi subpopulasi sesuai dengan limfokin yang dihasilkan. Secara umum sel Th1 dapat memproduksi limfokin yang menstimulasi makrofag dan sel T sitotoksik, sedangkan Th2 menghasilkan limfokin yang menstimulasi sel B untuk berproliferasi dan memproduksi antibodi. Sebaliknya Th3 menghasilkan sitokin yang terlibat pada regulasi atau *switching off* respon imun.[16]

Ekspresi sel $CD4^+$ positif kuat tampak pada gingiva kelompok kontrol yang diberi aquabides. Hasil ini sesuai penelitian Fujihashi *et al*.[7] bahwa dari isolasi sel mononuklear gingiva yang mengalami inflamasi dan dianalisis dengan *flow cytometry* menunjukkan sekitar 20-30% limfosit merupakan sel T $CD4^+$. Pendapat ini juga diperkuat dari pemeriksaan klinis pada gingiva kelompok kontrol yang masih mengalami inflamasi pada hari ke-14.

Pada kelompok perlakuan setelah pemberian minum minyak atsiri menunjukkan ekspresi $CD4^+$ positif lemah hanya di lamina propria. Hasil ini sesuai penelitian Seymour *et al*.[8] bahwa adanya ditemukan sel $CD4^+$ dalam jumlah banyak yang diisolasi dari jaringan periodontal yang mengalami inflamasi. Penelitian tersebut menggunakan *immunofluorescence* dan *flow cytometry*. Hasil Seymour *et al*.[8] tersebut juga mengemukakan bahwa terdapat penurunan sel $CD4^+$ pada jaringan gingiva yang sudah mengalami penyembuhan (*recovery*). Pada gingiva yang tidak mengalami kelainan dapat ditemukan sel $CD4^+$ dalam jumlah sedikit dengan rata-rata sel $CD4^+CD29^+$ (56±4%) dan $CD4^+CD45RA^+$ (40±4%).

Ada beberapa mekanisme yang diduga menyebabkan ekspresi $CD4^+$ positif lemah pada kelompok perlakuan. Mekanisme pertama bahwa pemberian minum minyak atsiri temu putih berkaitan dengan tidak terjadinya inflamasi pada gingiva. Hal ini kemungkinan disebabkan minyak atsiri temu putih mempunyai daya antimikroba terhadap bakteri *A. actinomycetemcomitans*. Hasil penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa minyak atsiri temu putih konsentrasi berkisar 4-28 mg/ml secara *in vitro* mempunyai daya antimikroba terhadap beberapa bakteri antara lain: *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus licheniformis* dan *Azotobacter*. Dosis minyak atsiri 28 mg/ml atau setara dengan 30,6 µl/ml yang digunakan pada penelitian ini.[17]

Mekanisme kedua bahwa kandungan minyak atsiri temu putih kemungkinan meng-hambat terjadinya inflamasi akibat paparan bakteri *A.actinomycetemcomitans*. Penelitian sebelumnya mengemukakan kandungan *fura-nodiene* dan *furanodienone* pada minyak atsiri temu putih dapat berefek sebagai anti inflamasi.[2] Seperti dikemukakan oleh Seymour[16] bahwa jumlah sel $CD4^+$ hanya sedikit pada gingiva yang mengalami penyembuhan atau gingiva normal.

Selain itu pemberian minum minyak atsiri temu putih diduga dapat meningkatkan respon imun tubuh sebagai mekanisme ketiga. Peningkatan respon imun tubuh dapat mencegah terjadinya inflamasi akibat infeksi bakteri melalui induksi aktivitas fagositosis makrofag. Makrofag dapat berperan pada respon imun *innate* maupun adaptif dengan fungsi fagositosis maupun *antigen presenting*

cell. Hasil penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa induksi fraksi polisakarida temu putih dosis 1 mg/ml mampu meningkatkan aktivitas fagostosis sel makrofag peritoneal RAW 264.7.[18] Disimpulkan bahwa minyak atsiri temu putih dapat berefek menurunkan ekspresi $CD4^+$ seiring dengan penurunan inflamasi gingiva.

KESIMPULAN

Induksi minyak atsiri temu putih dapat menurunkan inflamasi gingiva ditandai dengan penurunan ekspresi $CD4^+$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sunardi C, Dewi PNL, Sutedja L, Kardono LBS. Studi aktivitas antimikroba minyak atsiri dari rimpang *Kaemperia rotunda L.*, *Curcuma zedoaria Rosc.* dan *Curcuma mangga Val.Et ZIJP.* Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI.* Surabaya. 27-28 Maret 2002.
2. 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. 2006, 18 Maret 2008.
3. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. *Clinical Periodontology*, 9th Ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2002. H. 104-20.
4. Kelk P, Claesson R, Hänström L, Lerner UH,Kalfas S.Abundant Secretion of Bioactive Interleukin-1β by Human Macrophages Induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Leukotoxin. *Infect Immun.* 2005; 73(1): 453-8.
5. Fives-Taylor PM, Meyer D, MintzA. Virulence Factors of the periodonto pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J periodontol.* 1996; 67: 291-7.
6. Ashkenazi M, White RR, Dennison DK. Neutrophil modulation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Chemotaxis surface receptor expression and F-actin polymerization. *J Periodontal Re.* 1992; 27(4): 242-7.
7. Fujihashi K, Yamamoto M, Hiroi T, Bamberg TV, McGhee JR, Kiyono H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+)T cells isolated from inflamed human gingival tissues, *ClinExpImmunol*. 1996; 103: 422-8.
8. Seymour GJ, Taubman MA, Eastcott JW, Gemmell E, Smith DJ. CD29 expression on $CD4^+$ gingival lymphocytes supports migration of activated memory T lymphocytes to diseased periodontal tissue, *Oral MicrobiolImmunol*. 1997; 12(3): 129–34.
9. MüllerHP, Heinecke A, Zöller L, Fuhrmann A, Eger T.Gingivitis in young adults with *Actinobacillus actinomycetemcomitans.Clin Oral Investig.* 2001; 5(2): 83-8.
10. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Anti-Leu-3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol*. 1983; 131: 212-6.
11. Groh V, Tani M, Harrer A, Wolff K, Stingl G. Leu-3/T4 expression on epidermalLangerhans cells in normal and diseased skin. *J Invest Derm*. 1986; 86: 115-20.
12. Walsh LJ, Seymour GJ, Powell RN. Differential expression of Class II (DR and DQ) antigens by human gingiva Langerhans cells andkeratinocytes *in vitro*. *J Oral Path*. 1987; 16: 27-30.
13. Biddison WE, Rao PE, Talle MA, Goldstein G, Shaw S. Possible involvement of theOKT4 molecule in T cell recognition of Class IIHLA antigens. Evidence from studies of cytotoxicT lymphocytes specific for SB antigens. *J Exp Med.* 1982; 156: 1065-76.
14. Fischer A, Sterkers G, Charron D, Durandy A. Possible T4-HLA class II interaction as an essential event in antigen-specific helper T lymphocyte-dependent B cell activation. *Eur J Immunol* .1986; 16: 1111-6.
15. Walsh LJ, Parry A, Scholes A, Seymour GJ. Modulation of CD4 antigen expression on human gingival Langerhans cells by gamma interferon, *Clin Exp Immunol*. 1987; 70: 379-85
16. Eales LJ. Immunology for Life Scientist. 2nd Ed. England: Wiley; 2003. 90. H.16-224.
17. 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.
18. Kim KI, Shin KS, Jun WJ, Hong BS, Shin DH, Cho HY, Chang HI, Yoo SM, Yang HC. Effect of Polysaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. *BiosciBiotechnol Biochem.* 2001; 65(11): 2369-77.