

Efek Polisakarida *Mesona Chinensis* pada Produksi Sitokin dan Molekul Kostimulator pada Sel Makrofag RAW264.7

Effect of *Mesona Chinensis* Polysaccharide on Cytokine Production and Costimulatory Molecule on Macrophage RAW264.7

Andri Praja S¹, Tzou Chi H², Sumarno³

¹Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

²National Pingtung University of Science and Technology Taiwan

³Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Polisakarida yang berasal dari tumbuhan telah menjadi pusat perhatian pada keilmuan biomedik karena memiliki berbagai kemampuan biologis dan toksisitasnya yang rendah. Pada penelitian sebelumnya, polisakarida *Mesona chinensis* (MCP) yang didapat dari ekstrak tanaman *cincau* atau *grass jelly* telah menunjukkan kemampuannya sebagai imunostimulator dan anti kanker, akan tetapi bagaimana mekanismenya belum diketahui dengan jelas. Penelitian ini menginvestigasi pengaruh MCP pada sel makrofag RAW264.7 dimana pemeriksaan dilakukan melalui pengukuran produksi sitokin dan ekspresi molekul kostimulator pada permukaan sel makrofag. Beberapa teknik pengukuran telah digunakan untuk menggambarkan mekanisme aksi pada sel makrofag seperti flowsitometri untuk menganalisa kostimulator CD80, CD86 dan MHC-II, pengukuran viabilitas sel, *nitric oxide* (NO) dan TNF- α menggunakan spektrofotometer, ekspresi protein ERK $\frac{1}{2}$, I κ B- α , iNOS menggunakan teknik *western blot* dan analisa aktivitas protein NF- κ B menggunakan mikroskop konfokal. Pengukuran aktivitas NF- κ B, ekspresi CD80, CD86, MHC-II, produksi NO dan TNF- α dilakukan setelah diberikan MCP pada sel makrofag RAW264.7 dengan konsentrasi 10, 50, 100 dan 200 μ g/ml. Analisa statistik dengan ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi NO, TNF- α , CD80, CD86 dan MHC-II pada semua kelompok perlakuan, selanjutnya uji perbandingan multipel *Duncan's* menyatakan bahwa terdapat peningkatan ekspresi NO, TNF- α , CD80, CD86 dan MHC-II secara signifikan ($p=0,001$) bila dibandingkan dengan kelompok lain. Hasil diatas menunjukkan bahwa MCP mampu menginduksi produksi NO, TNF- α , ekspresi kostimulator (CD80, CD86, MHC-II), dan sebagai stimulator terhadap protein ERK $\frac{1}{2}$, I κ B- α , dan NF- κ B. Hal ini memberikan penjelasan terhadap mekanisme aktivitas seluler yakni melibatkan jalur MAPKs dan NF- κ B yang penting dalam menginduksi produksi sitokin dan ekspresi molekul kostimulator. Dengan demikian, MCP telah menunjukkan suatu potensi sebagai agen imunostimulator dan diduga dapat menjadi suatu terapi penting pada penyakit-penyakit infeksi.

Kata Kunci: Makrofag, NF- κ B, polisakarida *Mesona chinensis*

ABSTRACT

Polysaccharides derived from plants have been the center of attention in the biomedical area because it has a variety of biological ability and low toxicity. In previous study, *Mesona chinensis* polysaccharide (MCP), derived from plant extracts or grass jelly has demonstrated its ability as an immunostimulatory and anti-cancer, however the mechanism is not clear. This study investigated the effect of MCP on RAW264.7 macrophage cells in which the examination conducted by measuring cytokine production and expression of costimulatory molecules on macrophages cell surface. Several measurement techniques had been done to describe a mechanism of action on macrophages cells such as flow cytometry to analyze costimulatory molecules of CD80, CD86 and MHC-II, measurement of cell viability, nitrite oxide (NO) and TNF- α by spectrophotometer, protein expression of ERK $\frac{1}{2}$, I κ B- α , iNOS using western blot techniques and analysis of NF- κ B proteins activity using a confocal microscope. Measurement of NF- κ B activity, the expression of CD80, CD86, MHC-II, production of nitrite oxide and TNF- α were performed after treatment with MCP in RAW264.7 macrophage cells with concentrations of 10, 50, 100, and 200 μ g/ml. Statistical analysis using ANOVA showed the different expression of NO, TNF- α , CD80, CD86 and MHC-II on all treatment group, then by *Duncan's* multiple test identify significant difference of NO, TNF- α , CD80, CD86 and MHC-II expression ($p=0,001$) when compare with the other groups. Results above showed that MCP able to induce the production of NO, expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, MHC-II), and as a stimulator of the protein ERK $\frac{1}{2}$, I κ B- α and NF- κ B. This provides an explanation of the mechanism of cellular activity that involves MAPKs and NF- κ B pathways in inducing cytokine production and expression of costimulatory molecules. Thus, MCP has been demonstrated as a potential immunostimulatory agent and expected to be an important therapy in infectious diseases.

Keywords: Macrophage, NF- κ B, polysaccharide *Mesona chinensis*

PENDAHULUAN

Polisakarida yang diekstrak dari sumber botani seperti jamur, alga, lumut dan tumbuhan lainnya telah menjadi perhatian pada keilmuan biomedik disebabkan luasnya cakupan kemampuannya pada terapi dan rendah toksisitasnya (1). Pada tingkat seluler, polisakarida menunjukkan fungsinya sebagai senyawa cadangan di dalam sitoplasma atau komponen pembentuk struktur dinding sel pada organisme (2). Polisakarida merupakan ikatan antar molekul-molekul monosakarida melalui ikatan glikosidik, bentuk strukturnya dari lurus hingga bercabang-cabang (3).

Penelitian mengenai efek polisakarida terhadap respon makrofag menunjukkan bahwa polisakarida yang berasal dari tumbuhan dapat mengaktifasi makrofag (2). Oleh karena itu, untuk menemukan dan mengevaluasi polisakarida sebagai senyawa yang tepat untuk terapi imunologi merupakan suatu riset yang penting pada area biomedik (4,5). Aktivitas biologis polisakarida telah dilaporkan sebagai anti-tumor (6), imunostimulator (7), aktivitas anti komplemen (8) dan efek anti inflamasi (9). Banyak polisakarida yang diekstrak dari tumbuhan telah menunjukkan kemampuannya dalam meningkatkan fungsi makrofag seperti peningkatan aktivitas sitotoksik oleh makrofag melawan sel tumor dan mikroorganisme, mengaktifasi fagositik, peningkatan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan NO (*Nitric Oxide*), dan peningkatan sekresi sitokin dan kemokin serta memodulasi fungsi tersebut melalui teraktivasinya NF- κ B (1).

NF- κ B merupakan suatu faktor transkripsi yang terlibat penting dalam meregulasi respon imun non spesifik dan spesifik, proliferasi sel (10), sitokin (TNF, IL-1, IL-6), kemokin, molekul adesi endothelial (E-selektin) serta molekul kostimulatori (CD80, CD86) (11). Pada mamalia, *nuclear factor*- κ B (NF- κ B) secara struktur terdiri atas lima komponen protein yakni RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105 dan p50), dan NF- κ B2 (p100 dan p52) (10). Pada suatu kondisi di mana sel tidak mendapatkan stimulus, maka NF- κ B tetap bertahan dalam sitosol yang berikatan dengan I κ Bs sebagai penghambat aktivasi NF- κ B. I κ Bs berperan dalam menentukan lokasi seluler NF- κ B dalam sitoplasma, I κ Bs memiliki domain responsif sinyal yakni fosforilasi dan ubiquitinasi yang penting untuk respon terhadap degradasi I κ B. Pada saat sel mendapatkan stimulus maka NF- κ B akan terlepas dari kanonikal dan non-kanonikal I κ Bs sehingga sisi κ B pada NF- κ B akan berikatan dengan sekuen promotor yang selanjutnya akan mengaktifkan promotor tersebut pada sejumlah gen (12).

Berkaitan dengan aktivasi makrofag yang penting dalam regulasi respon imun, NF- κ B dalam hal ini berperan dalam meregulasi produksi sitokin (TNF- α , NO), dan ekspresi molekul kostimulatori (CD80, CD86). Produksi sitokin dan ekspresi molekul kostimulatori oleh makrofag juga erat kaitannya dengan peran *Toll-Like Reseptor* (TLR) dan *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR) dalam menerima rangsangan dari ekstraselular (10). Polisakarida *Mesona chinensis* (MCP) pertama kali dipublikasikan oleh Lin Shaoqin dan Zhu Sumin tahun 1992, penelitian tersebut menunjukkan bahwa MCP terdiri atas D-glucose, D-galactose, L-arabinose, xylose, rhamnose, galacturonic acid dan jenis gula yang tidak diketahui, selanjutnya dilakukan uji farmakologi yang menunjukkan MCP memiliki potensi sebagai imunostimulator dan efek anti kanker (13).

Penelitian lebih lanjut hingga saat ini terkait MCP belum menunjukkan kemajuan, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk melihat lebih lanjut efek MCP terhadap sel makrofag melalui pengamatan pada tingkat selular dengan menilai aktivitas sel makrofag berdasarkan produksi TNF- α dan NO, ekspresi CD80, CD86, MHC-II serta untuk melihat mekanisme jalur transduksi yang terlibat perlu pengamatan terhadap ekspresi dari NF- κ B.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mendapatkan polisakarida dari tumbuhan *Mesona chinensis*, membuktikan bahwa MCP dapat menginduksi sel makrofag (*Murine macrophage cell line* RAW264.7) dan mendeskripsikan mekanisme molekuler pada sel makrofag setelah diinduksi oleh MCP. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *posttest control group design*. Gambaran seluler pada makrofag dianalisis secara kuantitatif dan deskriptif. Data yang didapat diolah dengan menggunakan uji *one way ANOVA* dengan bantuan *software SPSS 16*.

Ekstraksi

Sampel 50 g MCP dilarutkan dengan 1500 ml 2D (*double distilled*) H₂O. Lalu direbus hingga tersisa 300 ml kemudian dilakukan dua kali penyaringan untuk mendapatkan larutannya. Larutan tersebut dicampurkan dengan alkohol 99% (rasio 1 banding 4) lalu disimpan di dalam pendingin selama 24 jam. Lalu campuran tersebut disaring kembali untuk mendapatkan filtrat, lalu filtrat diputar dengan 40 x 100rpm selama 8 menit. Kemudian pelet diinkubasi selama 3 hari dengan suhu 40°C, hasilnya di blender untuk mendapatkan serbuk ekstrak MCP.

Tes Viabilitas Sel

Penelitian ini menggunakan makrofag RAW.264.7, kultur sel menggunakan suplemen DMEM yang didapatkan dari *Gibco-invitrogen corp. USA*. dengan tambahan 3mmol/L glutamine, antibiotik (100U/mL penicillin) dan 10% serum fetal bovine pada 37°C dengan kadar CO₂ sebesar 5%. Makrofag diinkubasi tanpa perlakuan (kontrol) dan dengan perlakuan (LPS 25ng/mL dan MCP 10, 50, 100, 200 μ g).

Pengujian viabilitas sel menggunakan lempeng kultur sel 96 sumuran beralas datar dan setiap sumuran berisi 5x10⁵sel/ml. Lempeng sumuran yang berisi sel diinkubasi selama 30 menit, kemudian diberikan MCP (50-250 μ g/mL) dan untuk kontrol positif diberikan LPS (lipopolisakarida) 20ng/mL, lalu semua kelompok diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5%. Selanjutnya ditambahkan 25 μ l MTT pada setiap lempeng sumuran lalu diinkubasi selama 4 jam. Medium dikeluarkan dari lempeng sumuran dan ditambahkan 150 μ l DMSO, kemudian lempeng sumuran dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 570nm.

Pengukuran Produksi Sitokin

Penyiapan sampel menggunakan lempeng kultur sel 96 sumuran yang berisi masing-masing 5x10⁵sel/ml. selanjutnya ditambahkan LPS 20ng/mL dan untuk MCP yakni masing-masing (10, 50, 100, 200 μ g/mL) lalu diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya NO diukur dengan melihat besaran absorben (*optical density*) setiap sumuran melalui spektrofotometer panjang gelombang 570nm. Kemudian mediumnya digunakan untuk mengukur TNF- α dengan menggunakan ELISA Kit, lalu dibaca dengan

spektrofotometer 570nm.

Analisis Ekspresi Protein

Penyiapan sampel untuk *western blot* menggunakan lempeng kultur sel 6 sumuran dan diinkubasi selama 12 jam kemudian diberikan masing-masing yakni LPS, MCP (10, 50, 100, 150, dan 200 μ g/mL). Selanjutnya sel dikumpulkan sesuai sampel dan dicuci dua kali dengan PBS (*phosphate-buffered saline*). Kemudian sel dilisiskan menggunakan *lysis buffer* dan disimpan selama 30 menit pada suhu es. Konsentrasi protein sampel diukur dengan spektrofotometer, selanjutnya sampel melalui tahapan *western blot* dan hasilnya dibaca menggunakan *UPV Bioimaging system*. Penyiapan sampel untuk flow sitometri sama seperti penyiapan sampel pada *western blot* namun pada saat akan diuji, sampel diberikan pewarnaan dengan menggunakan FITC label antibodi monoklonal CD80, CD86 dan MHC-II selama 30 menit, kemudian dicuci dengan PBS lalu dianalisis menggunakan flow sitometri.

Analisis Mikroskop Konfokal

Sel dikultur pada gelas kaca dengan diameter 33 mm, selanjutnya diinkubasi dengan paraformaldehid 4% selama 30 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan campuran PBS, BSA 1%, dan Triton X-100 selama 5 menit sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasi dengan antibodi poliklonal (Alexa 594) selama 2 jam. Selanjutnya dicuci dengan PBS dan terakhir pewarnaan menggunakan 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI), sampel kemudian dianalisis menggunakan *confocal imager*.

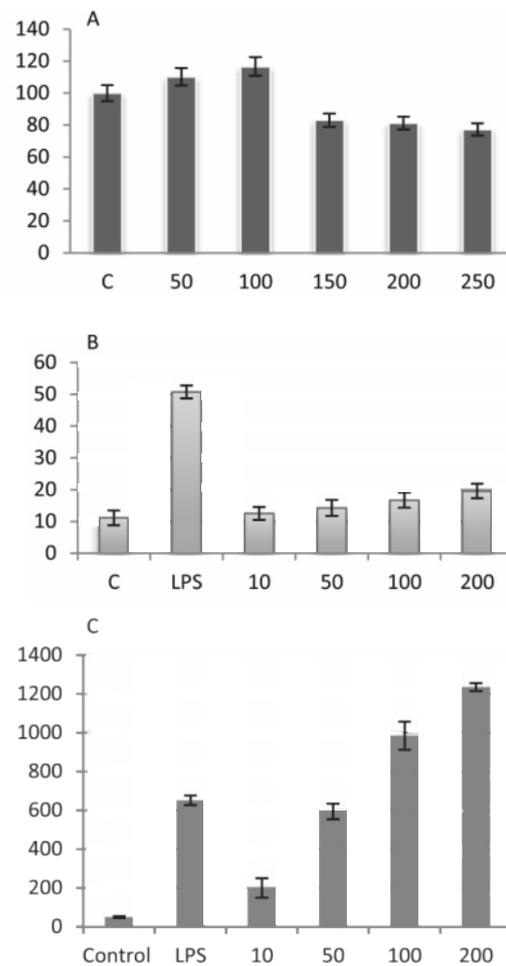
HASIL

Makrofag RAW.264.7 dapat bertahan lebih dari 70 persen pada semua konsentrasi MCP, yakni pada konsentrasi 50 dan 100 μ g menunjukkan lebih dari 100 persen sedangkan pada konsentrasi 150, 200, dan 250 μ g menunjukkan 70 sampai 80 persen (Gambar 1A). Hasil ini mengindikasikan bahwa MCP dapat digunakan sebagai perlakuan terhadap makrofag RAW.264.7., selanjutnya peneliti hanya menggunakan MCP konsentrasi 10, 50, 100, dan 200 μ g/ml sebagai perlakuan. Perlakuan MCP pada makrofag RAW.264.7 menyebabkan peningkatan produksi NO pada seluruh konsentrasi MCP (Gambar 1B). LPS sebagai kontrol positif menunjukkan pengaruh yang kuat terhadap produksi NO. Terjadi peningkatan produksi TNF- α secara signifikan yang distimulus oleh MCP (Gambar 2C). Pada konsentrasi 100 dan 200 μ g menunjukkan peningkatan produksi TNF- α yang melebihi kelompok LPS.

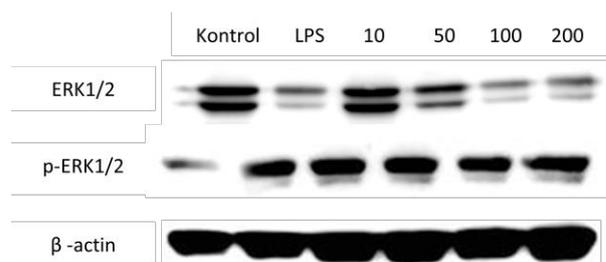
Kemampuan LPS dan MCP dalam menstimulasi makrofag RAW.264.7 diukur melalui ekspresi p-ERK $\frac{1}{2}$. Ekspresi pada p-ERK $\frac{1}{2}$ adalah proses fosforilasi dari ERK $\frac{1}{2}$ yang diduga akibat stimulasi LPS dan MCP sehingga pita ERK $\frac{1}{2}$ tipis pada LPS dan MCP 100 dan 200 (Gambar 2). Fosforilasi dari ERK $\frac{1}{2}$ diduga mampu menginduksi gen-gen inflamasi melalui jalur signaling MAPK dan mengaktifkan NF- κ B. LPS dan MCP (10, 50, dan 200 terbentuk tipis) mampu menginduksi fosforilasi pada I κ B- α menjadi p-I κ B- α (Gambar 3). Ikatan antara I κ B- α dan NF- κ B selanjutnya akan terlepas sehingga NF- κ B yang teraktivasi berpindah dari sitoplasma menuju nukleus untuk menginduksi gen-gen inflamasi. Ekspresi iNOS diinduksi oleh LPS dan MCP, namun tidak pada control (Gambar 4). Hal ini diduga bahwa NF- κ B telah mengaktifkan gen-gen inflamasi, salah

satunya mengekspresikan iNOS.

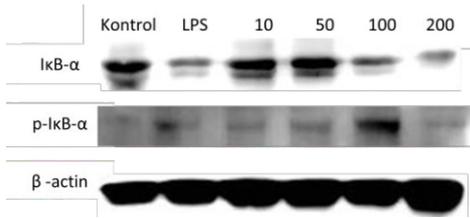
MCP menunjukkan pengaruh pada translokasi NF- κ B yang dikonfirmasi melalui mikroskop konfokal, gambar diambil dengan ukuran 10 μ m (Gambar 5). Pada gambar tampak NF- κ B berwarna merah (Anti-NF- κ B), nukleus berwarna biru (DAPI) dan penggabungan keduanya (*Merge*). Pada kontrol tampak NF- κ B tidak terjadi translokasi ke nukleus, LPS menunjukkan translokasi NF- κ B yang terakumulasi di nukleus. MCP juga menunjukkan translokasi NF- κ B ke nukleus walaupun sangat sedikit (10 μ g, 50 μ g, dan 100 μ g) dan pada MCP 200 μ g, NF- κ B tampak terlihat pada sitoplasma dan nukleus.



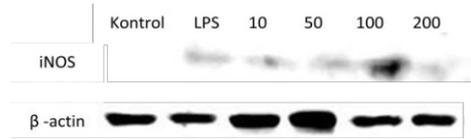
Gambar 1. Viabilitas sel (A, %), produksi NO (B, μ M), produksi TNF- α (C, pg/ml) pada sel RAW264.7 dengan dan tanpa perlakuan LPS dan MCP 10-200 μ g/mL. Nilai dinyatakan sebagai rerata \pm S.D. (n = 3).



Gambar 2. Ekspresi protein ERK $\frac{1}{2}$, p-ERK $\frac{1}{2}$ dan β -actin pada RAW264.7

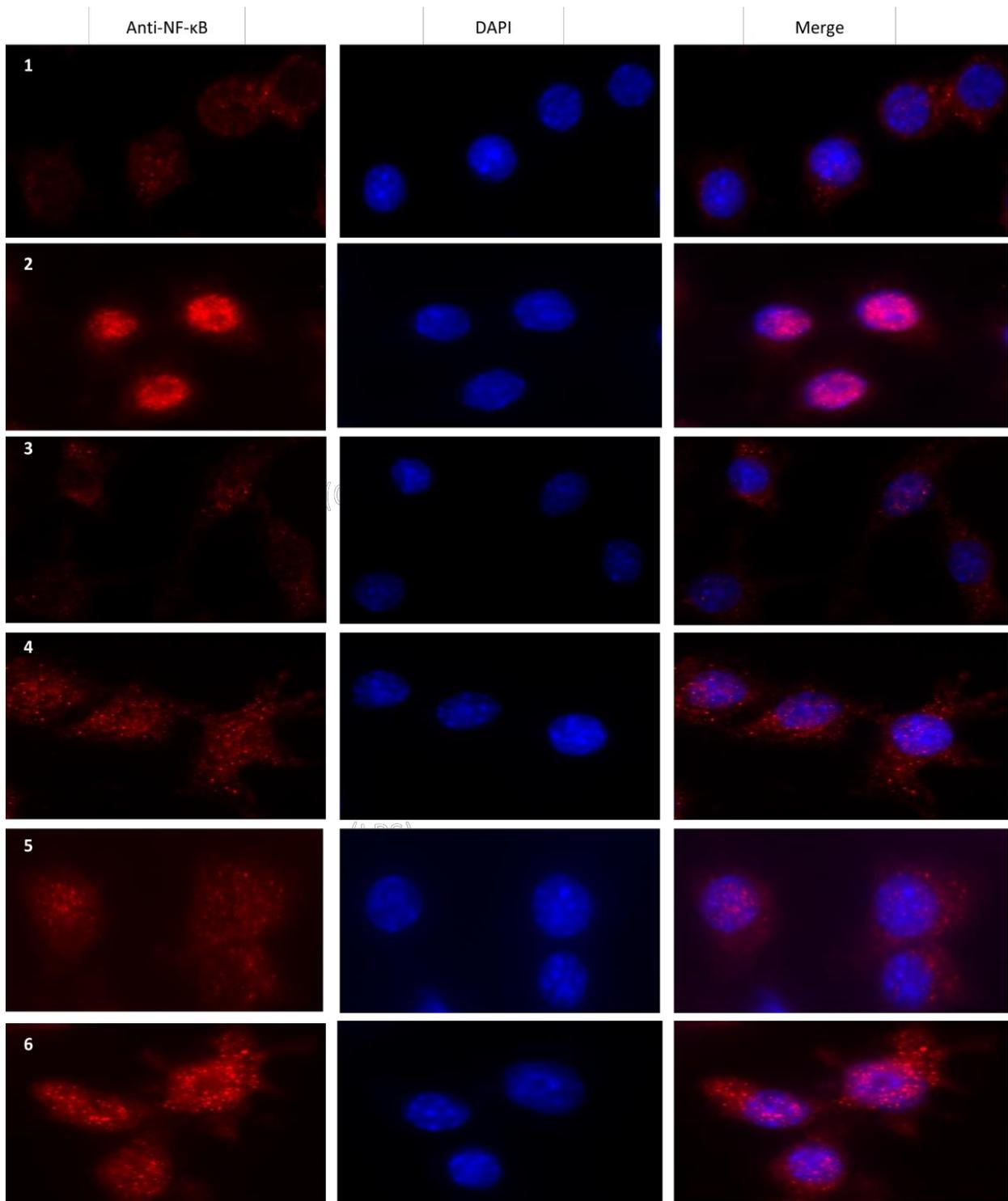


Gambar 3. Ekspresi protein IκB-α, p-IκB-α dan β-actin pada RAW.264.7



Gambar 4. Ekspresi iNOS dan β-actin pada sel RAW.264.7

Pemeriksaan *flow cytometry* menunjukkan LPS menginduksi ekspresi CD80, CD86 dan MHC II lebih kuat



Gambar 5. Ekspresi protein NF-κB pada RAW.264.7. (1) Kontrol tanpa perlakuan apapun; (2) LPS 25ng/ml; (3) MCP 10µg/ml; (4) MCP 50µg/ml; (5) MCP 100µg/ml; dan (6) MCP 200µg/ml.

dari kontrol dan MCP, namun pada MCP dengan konsentrasi 10 µg hampir mendekati LPS (Tabel 1). Pada konsentrasi 50, 100, dan 200µg MCP diduga justru menekan ekspresi dari CD80, CD86, dan MHC II. Data berdistribusi normal (uji *Shapiro Wilk*) dan uji homogenitas menunjukkan data homogen ($p>0,05$), selanjutnya uji ANOVA memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi pada NO, TNF- α , CD80, CD86, dan MHC-II. Uji *post hoc* (perbandingan multipel *Duncan's*) untuk melihat Signifikan perbedaan antar kelompok menunjukkan $p=0,001$ yang artinya terdapat perbedaan signifikan pada tiap kelompok.

Tabel 1. Ekspresi dari CD80, CD86, MHC II

Kelompok (µg/ml)	RRAW264.7 cells		
	CD80*	CD86*	MHC-II*
Kontrol	79,7	72,6	77,3
LPS	116	114,2	112
10	106,4	98,5	101,3
50	86,7	89,1	91,4
100	84,3	80,6	84,7
200	83,3	76,7	80,1

Keterangan: *Rerata \pm S.D., (n= 3), $p=0,001$, intensitas fluoresensi (%)

DISKUSI

Polisakarida merupakan makromolekul biologik yang memiliki kemampuan imunomodulator, anti tumor, anti oksidan dan anti inflamasi (14). MCP adalah polisakarida yang diekstrak dari tanaman *Mesona chinensis*. MCP termasuk polisakarida yang tidak larut dalam air dan termasuk golongan heteropolisakarida karena mengandung lebih dari satu jenis monosakarida pembentuknya (13). Penelitian ini mengidentifikasi struktur MCP yang diketahui melalui analisis spektroskopi FT-IR (*Fourier transform infrared*) dan NMR (*Nuclear magnetic resonance*) yang mengindikasikan bahwa MCP memiliki senyawa biologi aktif yakni α -D-glucans and β -configuration (data tidak ditampilkan). Senyawa ini mampu meningkatkan karakteristik kimia dan menunjukkan efek biologik (14). Beberapa aktivitas biologiknya yakni anti tumor, anti viral, anti bakteri, anti fungi dan imunomodulator (15). Pada penelitian ini, MCP mampu menginduksi produksi *nitric oxide*, TNF- α dan molekul kostimulator CD80, CD86 dan MHC-II pada makrofag yang teraktivasi. MCP juga menstimulasi protein ERK $\frac{1}{2}$ (MAPKs) dan I κ B- α pada hasil tes *western blot*, yang akan membantu dalam menjelaskan mekanisme molekuler pada makrofag (RAW264.7).

Berdasarkan tes MTT (*colorimetric assay*), makrofag tetap bertahan hingga 70 persen pada konsentrasi 200 µg/ml MCP, sehingga diyakini bahwa MCP menunjukkan toksitas yang rendah terhadap makrofag sehingga studi ini dapat dilanjutkan. Pada banyak publikasi dan penelitian dijelaskan bahwa makrofag dapat teraktivasi setelah mendapatkan perlakuan dengan menggunakan PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) seperti LPS (Lipopolisakarida yang berasal dari bakteri gram negatif yang dapat merangsang respon imun). Makrofag yang teraktivasi akan mampu berfungsi seperti *professional APCs* dan dapat menginduksi sel T *primer* melalui peningkatan ekspresi molekul MHC-I dan -II, dan

molekul kostimulator seperti CD80, CD86, CD40 dan CD54 (16,17).

Pada studi ini, MCP dapat merangsang ekspresi molekul CD80, CD86 dan MHC-II pada makrofag, namun pada perlakuan MCP dengan konsentrasi tinggi menunjukkan penurunan ekspresi molekul tersebut. Hal ini diduga bahwa pada MCP konsentrasi tinggi, makrofag justru mempertahankan rendahnya ekspresi molekul kostimulator melalui penghambatan jalur MAPK *kinase* atau jalur translokasi NF- κ B untuk aktivasi gen. Suatu molekul target mungkin terlibat didalam aktivitas nukleus termasuk aktivasi lanjutan dari NF- κ B (18) dan penyusunan pada mesin transkripsional yang membutuhkan banyak keterlibatan molekul (19), namun untuk dapat diketahui lebih detail perlu penelitian lanjutan. Selanjutnya, Interaksi molekul CD80/CD86 dengan CD28 pada sel T dapat meningkatkan kekuatan sinyal melalui reseptor sel T (TCR) dan MHC/*peptide complex* yang erat kaitannya dengan aktivasi sel T di dalam suatu respon imun spesifik (16).

Namun sebaliknya, penghambatan pada interaksi CD80 atau CD86 dengan CD28 dapat menekan aktivasi sel T, sehingga menyebabkan sel T mengalami anergi. Paradigma klasik menjelaskan bahwa presentasi antigen oleh APCs bahwa *endogenous* antigen akan dipresentasikan melalui MHC-I kepada sel T CD8+, sedangkan *exogenous* antigen akan dipresentasikan melalui MHC-II kepada sel T CD4+ (16,20). Dalam rangka proses presentasi tersebut pada *peptide antigenic* melalui MHC, APCs berperan sentral dalam mengontrol diferensiasi sel T helper CD4+ melalui produksi sitokin seperti TNF- α (21,22).

Selain itu, diduga bahwa ikatan CD80 menstimulasi suatu respon T helper 1, yang dihasilkan didalam sekresi sitokin kemudian menstimulasi respon imun selular termasuk inflamasi, yang mana ikatan pada CD86 menimbulkan suatu respon sel T helper 2, yang dikarakteristikan melalui sitokin anti inflamatori dan pro humoral (16,23). Berdasarkan interaksi antara makrofag terhadap Th1 dan Th2, ekspresi CD80, CD86 dan MHC-II yang rendah pada makrofag akan menyebabkan interaksi menjadi lemah sehingga Th1 dan Th2 mungkin berinisiasi menjadi apoptosis atau anergi dan interaksi tersebut tidak melepaskan sitokin yang mana penting untuk aktivasi makrofag, hasil ini diduga menjadi karakteristik sebagai anti inflamatori (24).

TNF- α merupakan mediator pada inflammasi akut yang merespon adanya bakteri dan infeksius mikroba lainnya. TNF- α diproduksi oleh sel makrofag, sel dendritik dan beberapa tipe sel lainnya. Suatu rangsangan seperti sitokin dapat berikatan dengan beberapa reseptor TNF, seperti TNF-RI, TNF-RII, dan CD40, yang menyebabkan TNF *receptor-associated factors* (TRAFs) bergerak menuju sitoplasma dan TRAFs mengaktivasi faktor transkripsi NF- κ B dan AP-1. TNF yang diproduksi oleh makrofag dapat distimulasi oleh PAMPs (TLRs dan PRRs) dan DAMPs. Sejumlah besar sitokin ini diproduksi selama terjadinya infeksi oleh bakteri gram negatif dan gram positif yang melepaskan LPS dan asam *lipoteichoic* dari dinding sel bakteri tersebut (25).

Pada penelitian ini MCP dapat menginduksi produksi TNF- α pada makrofag lebih kuat dari LPS pada 100 dan 200 µg/ml (Gambar 1). MCP diduga berikatan dengan TLR 4 yang kemudian meneruskan stimulus tersebut secara

transduksi untuk mengekspresikan TNF- α melalui jalur MAP kinase melalui fosforilasi protein kinase seperti MAPK (ERK $\frac{1}{2}$) (Gambar 2). Ekspresi TNF- α sepenuhnya dikontrol oleh faktor transkripsi NF- κ B (Gambar 5), hal ini terjadi akibat fosforilasi I κ B- α (Gambar 3) yang terdegradasi dan kemudian membebaskan NF- κ B yang bergerak menuju nukleus untuk mengaktifasi ekspresi gen (Gambar 6).

NO (*Nitric oxide*) adalah produk yang dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi oleh sitokin, material dari mikroba atau keduanya. NO berasal dari asam amino L-arginine melalui aktivitas enzimatis pada *inducible oxide synthase* (iNOS atau NOS2) dan berfungsi sebagai tumorisidal dan anti mikrobial pada *in vitro* dan *in vivo* (26). Perlakuan MCP pada makrofag menunjukkan peningkatan produksi NO walaupun tidak terlalu kuat dibandingkan dengan LPS. NF- κ B merupakan protein penting yang dibutuhkan untuk aktivitas beberapa ekspresi gen pro-inflamatori seperti ekspresi pada iNOS (Gambar 4) dan NO (Gambar 1).

Pada mamalia, terdapat sekitar sepuluh TLRs yang memiliki fungsi berbeda-beda didalam reaksi pengenalan pada respon imun. TLRs dapat mengenali ligannya melalui suatu ikatan (kontak) secara langsung dan dapat berfungsi sebagai *pattern recognition receptors* (PRRs), yakni reseptor yang diekspresikan oleh sel imun non spesifik untuk mendeteksi patogen dan menginisiasi respon imun non spesifik dan spesifik. *Human* TLR4 merupakan karakteristik pertama yang diketahui pada mamalia dan kebanyakan diekspresikan pada berbagai tipe sel termasuk makrofag. TLR4 juga berfungsi sebagai reseptor terhadap sinyal transduksi dari LPS (27).

Kami menduga TLR4 berperan dalam menerima MCP yang kemudian menginduksi NF- κ B yang dibutuhkan untuk efisiensi presentasi antigen melalui suatu rangsangan seperti pada LPS. Pada jalur NF- κ B, data menunjukkan bahwa MCP mampu meningkatkan aktivitas NF- κ B, yang dalam proses aktivasi NF- κ B terjadi fosforilasi pada I κ B- α melalui hasil I κ B- α *kinase* didalam ubiquitinasi dan degradasi proteasomal, kemudian ikatan I κ B- α pada NF- κ B akan terlepas, sehingga NF- κ B translokasi menuju

nukleus dan berikatan pada elemen promoter κ B untuk menghasilkan aktivitas ekspresi gen (28).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa MAPKs dapat terinduksi oleh LPS yang memediasi induksi pada beberapa gen inflamatori dan penting untuk mengaktifasi NF- κ B. MAPKs terlibat pada LPS yang menginduksi ekspresi molekul pada permukaan makrofag, misalnya JNK memediasi LPS yang menginduksi ekspresi CD80, CD83, CD40, dan CD54 (29), dan p38 *kinase* memediasi LPS yang menginduksi CD80, CD83, CD86, CD40, CD54, dan ekspresi HLA-DR (30,31). Kemampuan LPS untuk mengaktifasi NF- κ B sehingga mengekspresikan molekul kostimulator pada permukaan makrofag tampaknya juga dimiliki oleh banyak polisakarida, namun beberapa polisakarida juga mampu menghambat maupun menekan ekspresi dari molekul tersebut (1).

Selanjutnya, kami juga menduga dalam hal memaksimalkan aktivasi beberapa gen, mungkin terjadi *crossstalk* antara MAPKs dan NF- κ B, *crossstalk* merupakan suatu kondisi dimana pada jalur transduksi sinyal terdapat saling berbagi komponen, yang mana komponen tersebut dapat berinteraksi dengan jalur lainnya sehingga meningkatkan suatu efek dari sinyal tersebut (16). Untuk mengetahui pengaruh MCP pada salah satu anggota MAPKs yakni *extracellular signal-regulated kinase* (ERK $\frac{1}{2}$) dilakukan teknik *western blot*, kami menemukan bahwa MCP menginduksi aktivitas ERK $\frac{1}{2}$ di dalam makrofag (Gambar 3). Hasil ini mengindikasikan bahwa peningkatan pengaruh MCP pada presentasi antigen berkaitan dengan aktivitas ERK $\frac{1}{2}$ dan NF- κ B sebagai potensial target.

MCP menunjukkan karakteristiknya sebagai agen imunostimulator, yakni mampu menginduksi produksi NO, TNF- α , ekspresi molekul kostimulatori (CD80, CD86, dan MHC-II) melalui suatu mekanisme seluler yang melibatkan jalur sinyal MAPKs dan NF- κ B. Pada konsentrasi tinggi MCP justru menekan ekspresi dari molekul kostimulator yang mana penting dalam interaksi makrofag dan sel T, hal ini menunjukkan aktivitasnya sebagai agen anti inflamasi. Walaupun demikian, untuk memastikan hal tersebut perlu ada penjelasan mekanisme yang kompleks terhadap aktivitas MCP didalam aktivitasnya sebagai anti inflamasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Schepetkin IA and Quinn MT. *Botanical Polysaccharide: Macrophage Immunomodulation and Therapeutic Potential*. International Immunopharmacology. 2006; 6(3): 317-333.
- Popa V. *Polysaccharide in Medicinal and Pharmaceutical Applications*. 1st edition. Shawbury, United Kingdom; iSmithers; 2011.
- Chen GT, Ma XM, Liu ST, Liao YL, and Zhao GQ. *Isolation, Purification and Antioxidant Activities of Polysaccharides from Grifola Frondosa*. Carbohydrate Polymers. 2012; 89(1): 61-66.
- Benzie IFF and Galor SW. *Herbal Medicine; Biomolecular and Clinical Aspects*. 2th edition. New York: CRC Press; 2011; p. 453-461.
- Pan H, Han Y, Huang J, et al. *Purification and Identification of a Polysaccharide from Medicinal Mushroom Amauroderma Rude with Immunomodulatory Activity and Inhibitory Effect on Tumor Growth*. Oncotarget. 2015; 6(19): 17777-17791.
- Lv Y, Shan X, Zhao X, et al. *Extraction, Isolation, Structural Characterization and Anti-Tumor Properties of an Apigalacturonan-Rich Polysaccharide from the Sea Grass Zostera Caespitosa Miki*. Marine Drugs. 2015; 13(6): 3710-3731.
- Wang CL, Lu CY, Pi CC, et al. *Extracellular Polysaccharide Produced by Ganoderma Formosanum Stimulate Macrophage Activation Via Multiple Pattern-Recognition Receptors*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2012; 12: 119-128.
- Zhang W, Jin W, Sun D, et al. *Structural Analysis and Anti-Complement Activity of Polysaccharides from Kjellmaniella Crsaifolia*. Marine Drugs. 2015; 13(3): 1360-1374.
- Kang SM, Kim KN, Lee SH, et al. *Anti-Inflammatory Activity of Polysaccharide Purified from AMG-Assistant Extract of Ecklonia Cava in LPS-Stimulated*

- RAW 264.7 *Macrophages*. Carbohydrate Polymers. 2011; 85(1): 80-85.
10. O'Dea E and Hoffmann A. *NF- κ B signaling*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. 2009; 1(1): 107-115.
 11. Abbas AK, Litchman AH and Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2012; p. 55-87.
 12. Arvaniti E, Ntoufa S, Papakonstantinou N, et al. *Toll-Like Receptor Signaling Pathway In Chronic Lymphocytic Leukemia: Distinct Gene Expression Profiles Of Potential Pathogenic Significance In Specific Subsets Of Patients*. Haematologica. 2011; 96(11); 1644-1652.
 13. Shaoqin L and Sumin Z. *Study on Mesona Chinensis Polysaccharide. Isolation, Purification and Identification*. Natural Product Research and Development. 1992; 3.
 14. Luo A and Fan Y. *Immune Stimulating Activity of Water-Soluble Polysaccharide Fractions from Dendrobium nobile Lindl*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011; 5(5): 625-631.
 15. Xu X, Yasuda M, Nakamura-Tsuruta S, Mizuno M, and Ashida H. *Beta-Glucan from Lentinus Edodes Inhibits NO and TNF- α Production and Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinases in LPS-Stimulated Murine RAW 264.7 Macrophages*. The Journal of Biological Chemistry. 2012; 287(2): 871-878.
 16. Park SY and Kim YH. *Surfactin Inhibits Immunostimulatory Function of Macrophages through Blocking NK- κ B, MAPK, and Akt Pathway*. International Immunopharmacology. 2009; 9(7-8): 886-893.
 17. Buhler L, Alwayn IP, Basker M, et al. *CD40-CD154 Pathway Blockade Requires Host Macrophages To Induce Humoral Unresponsiveness To Pig Hematopoietic Cells In Baboons*. Transplantation. 2001; 72(11): 1759-1768.
 18. Neumann M and Naumann M. *Beyond Ikbs: Alternative Regulation of NF- κ B Activity*. The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology. 2002; 21(11): 2642-2654.
 19. Smale ST. *Selective Transcription in Response to an Inflammatory Stimulus*. Cell. 2010; 140(6): 833-844.
 20. Chen L and Flies DB. *Molecular Mechanism of T Cell Co-Stimulation and Co-Inhibition*. Nature Reviews Immunology. 2013; 13(4): 227-242.
 21. Yamano T, Steinert M, and Klein L. *Thymic B Cells and Central T Cell Tolerance*. Frontier in Immunology. 2015; 6: 5.
 22. Ley K. *The Second Touch Hypothesis: T Cell Activation, Homing and Polarization*. F1000Research. 2014; 3: 37.
 23. Chen S, Ding R, Zhou Y, Zhang X, Zhu R, and Gao XD. *Immunomodulatory Effect of Polysaccharide from Marine Fungus Phoma Herbarum YS4108 on T Cell And Dendritic Cells*. Hindawi Publishing Corporation. 2014; 2014: 13.
 24. Serhan CN, Ward PA and Gilroy DW. *Fundamentals of Inflammation*. New York: Cambridge University Press. 2010; p. 98-104.
 25. Matsuoka T, Shamji MH, and Durham SR. *Allergen Immunotherapy and Tolerance*. Allergology International. 2013; 62(4): 403-413.
 26. Cruse JM and Lewis RE. *Atlas of Immunology*. 3rd edition. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2010; p. 370-372.
 27. Hume DA. *The Many Alternative Faces of Macrophage Activation*. Frontiers in Immunology. 2015; 6: 370.
 28. Yamauchi S, Ito H, and Miyajima A. *I κ B η , a Nuclear I κ B Protein, Positively Regulates the NF- κ B-Mediated Expression of Proinflammatory Cytokines*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010; 107(26): 11924-11929.
 29. Kim EK and Choi EJ. *Pathological Roles of MAPK Signaling Pathway in Human Diseases*. Biochimica et Biophysica Acta. 2010; 1802(4): 396-405.
 30. Huo M, Cui X, Xue J, et al. *Anti-Inflammatory Effects of Linalool in RAW264.7 Macrophages and Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury Model*. Journal of Surgical Research. 2013; 180(1): E47-E54.