

Carboxymethyl Chitosan Reduces Mast Cell Degranulation Induced By Ovalbumin

Karboksimetil Kitosan Menurunkan Degranulasi Mast Cell yang Diinduksi Oleh Ovalbumin

Mohamad Nur Ibrahim*, Edi Widjajanto**, Nur Permatasari***, Akhmad Sabarudin****

*Jurusan Perikanan FPIK Universitas Haluoleo Kendari

**Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

***Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

****Laboratorium Kimia Analitik FMIPA Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Ovalbumin is known as mast cell degranulating agent through the FCεRI aggregation. Carboxymethyl chitosan (CMCs), a biocompatible cationic polymer was evaluated to reduce mast cell degranulation induced by ovalbumin. In this experiment, wistar rats were divided into 5 groups which consist of 1 control group and 4 allergen groups. Among the allergen groups, 3 groups were treated with carboxymethyl chitosan/CMCs (doses : 0,25 mg, 0,50 mg and 1,00 mg) for 22 days. The result showed a significant ($P < 0,01$) reduction in mast cell degranulation in allergen groups. This finding indicates that CMCs possess antiinflammation activity mediated by reducing of mast cell degranulation.

Keywords : carboxymethyl chitosan, mast cell degranulation

PENDAHULUAN

Seperti sel lainnya di dalam tubuh, *mast cell* menerima *signal multiple* dari lingkungannya untuk mengatur pertumbuhan, diferensiasi dan kelangsungan hidupnya. Signal-signal tersebut menentukan jumlah dan tipe *mast cell* pada jaringan dan penyakit tertentu serta mengatur aktivitasnya. Aktivitas mastosit (*mast cell*) selalu dipicu oleh beberapa agen kimia antara lain, antibiotik, kalsium ionoforn dan anafilatoksin serta antigen yang terpapar berulang-ulang. *Mast cell* merupakan sel yang hanya ditemukan pada jaringan yang berhubungan dengan pembuluh darah (1). Pembentukan *mast cell* (mastoposis) berawal dari sumsum tulang. Sel induk hematopoiesis (SIH), atau *hematopoietic stem cell* (HSC) pada sumsum tulang tumbuh menjadi sel calon-*mast cell*, kemudian menyebar ke seluruh tubuh mengikuti aliran darah, tempat dimana jaringan yang sesuai akan keluar dari pembuluh darah dan tumbuh menjadi *mast cell* dewasa (2).

Mast cell merupakan komponen seluler dari sistem imun, distribusinya perivaskuler dan tersebar pada berbagai daerah *port of entry* (3,4). Sebagai sel imun, *mast cell* memiliki berbagai kemampuan sebagaimana yang dimiliki oleh neutrofil dan makrofag, selain itu *mast cell* masih mempunyai kelebihan dalam hal umur panjang dan memiliki FCεRI, reseptor untuk IgE (4). Ketika antigen masuk ke dalam tubuh maka secara imunologis antigen tersebut merangsang sel B untuk membentuk IgE dengan bantuan sel Th. Antibodi akan terbentuk dan mengikat antigen yang masuk ke dalam tubuh selanjutnya antibodi IgE diikat oleh *mast cell* melalui reseptornya. Apabila tubuh terpajan ulang dengan antigen yang sama, maka antigen tersebut akan

diikat oleh IgE yang sudah ada dipermukaan *mast cell*.

Akibat ikatan silang antigen-antibodi-reseptornya pada permukaan *mast cell*, *mast cell* akan mengalami signal transduksi yang akhirnya terjadi degranulasi dengan melepaskan mediator yang sudah tersimpan sebelumnya antara lain adalah histamin dan histamin ini dapat menimbulkan gejala reaksi hipersensitifitas tipe 1. Selain histamin, mediator lain seperti prostaglandin dan leukotrien yang dihasilkan dari metabolisme asam arakidonat berperan pada fase lambat reaksi tipe 1 tersebut (5).

Prostaglandin dan leukotrien merupakan mediator yang harus dibentuk lebih dahulu dari metabolisme asam arakidonat atas pengaruh *fosfolipase A2*. Sehingga mediator-mediator itu disebut sebagai mediator yang baru terbentuk. Efek yang ditimbulkan dari mediator-mediator ini adalah kontraksi otot polos, sekresi mucus meningkat, resistensi saluran nafas meningkat dan lain-lain sebagainya. Untuk menghindari efek dari mediator ini harus ada agen farmakologis yang digunakan untuk mencegah degranulasi *mast cell*. Agen farmakologis yang digunakan salah satunya adalah kitosan larut dalam air (6).

Karboksimetil kitosan (KMK) merupakan salah satu derivat kitosan yang bersifat larut dalam air. KMK tidak beracun serta bersifat *biodegradable* dan *biocompatible* (7). Karboksimetil Kitosan banyak dimanfaatkan pada bidang farmasi dan kesehatan seperti hydrogel, *cholesterol reducer* dan antibakteri (8-10). Makrofag dapat diaktivasi oleh karboksimetil kitin ataupun karboksimetil kitosan (11).

Penelitian ini bertujuan mempelajari pemanfaatan karboksimetil kitosan sebagai agen farmakologis yang digunakan untuk menghambat degranulasi *mast cell* pada mesenterium tikus yang dipapar dengan ovalbumin.

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXV, No. 1, April 2009
Korespondensi: Mohamad N Ibrahim, Jurusan Perikanan
FPIK Universitas Haluoleo Kendari; Telepon:
081524713710

METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Anatomi dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada mesenterium tikus. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih betina galur wistar dengan berat badan 140 - 150 g yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Setelah diadaptasikan selama 1 minggu, Tikus di kelompokkan menjadi lima kelompok masing-masing lima ekor secara acak. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol. Kelompok kedua adalah kelompok sensitisasi dengan pemberian ovalbumin intra-peritoneal (ip) modifikasi metode peneliti sebelumnya (12,13). Kelompok ketiga, keempat, kelima adalah kelompok perlakuan yaitu sensitisasi ovalbumin dan pemberian KMK. Metode sensitisasi terdiri dari 3 tahap yaitu: 1). sensitisasi awal pada hari pertama, melalui rute injeksi intraperitoneal dengan ovalbumin dosis 100 µg yang dilarutkan dengan PBS, 2). sensitasi kedua dilakukan pada hari ke delapan melalui injeksi intraperitoneal dengan ovalbumin dosis 200 µg yang dilarutkan dalam PBS, 3). sensitasi ketiga dilakukan pada hari ke dua puluh dua melalui per oral dengan ovalbumin dosis 200 mg yang dilarutkan dalam almenium hidroksida dan PBS. Karboksimetil kitosan diberikan per oral setiap hari selama 22 hari dengan dosis 0,25 mg, 0,50 mg dan 0,10 mg pertikus perhari.

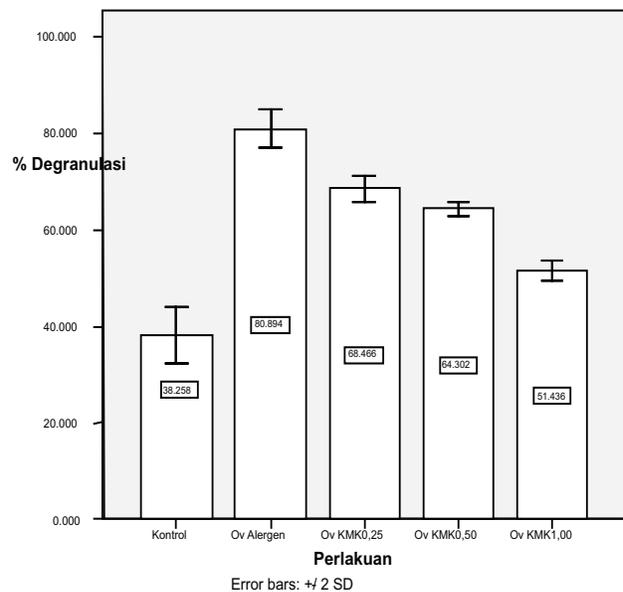
Bahan yang digunakan adalah tikus putih wistar betina, pakan standar, ovalbumin, Al(OH)₃, PBS(NS), karboksimetil kitosan, aquades, eter, bufer formaldehid 10%, meyer albumin, toluidine blue, canada balsem. Sedangkan peralatan yang digunakan adalah kandang tikus, baki, spoit dan jarum, sonde, tabung reaksi, gunting bedah, pinkset, slide, cover slide, kotak film, penjepit kertas, gelas kimia, pipet, kuas, mikroskop dan kamera. Kelima kelompok tikus dibedah melalui pembiusan dengan eter, setelah benar-benar pingsan kemudian dilakukan penyayatan. Penyayatan dimulai dari anus sampai ke bagian paru sehingga terlihat usus pada bagian perut kemudian pangkalnya dipotong untuk mempermudah pengambilan mesenterium. Pengambilan mesenterium harus memiliki pembuluh darah sambil ditetesi dengan PBS untuk membersihkannya dari bercak darah ataupun mucus. Selanjutnya direntangkan di atas *slide* preparat/D glass yang sudah diolesi dengan meyer albumin.

Setelah mesenterium direntangkan di atas *D glass*, mesenterium dicuci kembali dengan PBS. Kurang lebih 15 menit mesenterium diberi beberapa tetes toluidine blue sampai betul-betul kering selanjutnya dipotong sesuai ukuran *cover glass*. Dimounting atau direkatkan dengan entelan/canada balsem selanjutnya ditutup dengan *cover glass* kemudian dikering-anginkan. Pengamatan *mast cell* dengan mikroskop dan pengambilan gambar. Perhitungan *mast cell* dilakukan pada area perivascular dibagi dalam enam lapang pandang.

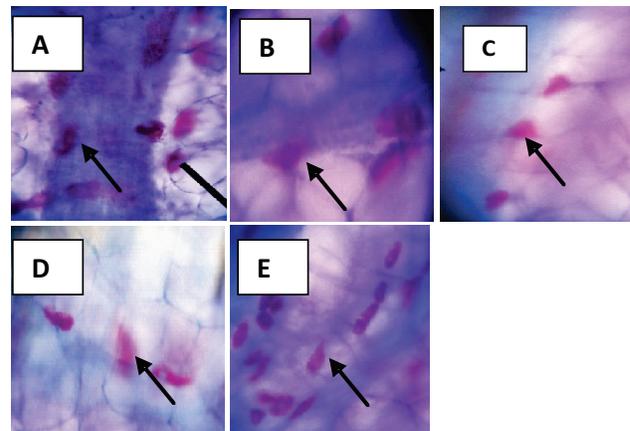
Variabel yang diamati adalah jumlah prosentase *mast cell* yang terdegranulasi. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji *duncan multiple range test* untuk mengetahui perbedaan masing-masing perlakuan.

HASIL

Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa pemberian karboksimetil kitosan (KMK) dapat menghambat degranulasi *mast cell* akibat paparan berulang dengan ovalbumin ($P < 0,01$). Uji *duncan multiple range test*, menunjukkan bahwa pemberian KMK dosis 1 mg, dosis 0,50 mg dan dosis 0,25 mg memberikan efek hambat yang signifikan terhadap degranulasi *mast cell*. Perbedaan jumlah degranulasi mast sel yang signifikan juga ditemukan antara kontrol dan alergen ($P < 0,01$).



Gambar 1. Nilai Rerata Prosentase Degranulasi *Mast Cell* yang Dipapar dengan Ovalbumin.



Gambar 2. *Mast Cell* yang di Cat dengan *Toluidine Blue* pada Jaringan Mesenterium Tikus Setelah Dipapar dengan Ovalbumin dan tidak Dipapar.

Keterangan: A = Kontrol, B = KMK 0,25 mg, C = KMK 0,50 mg, D = KMK 1,0 mg dan E = perlakuan Alergen. Pembesaran 400 X.

DISKUSI

Prosentase degranulasi *mast cell* adalah hasil perbandingan dari jumlah *mast cell* terdegranulasi dan jumlah total *mast cell* pada enam area lapang pandang yang dikalikan dengan seratus persen. Pada umumnya *mast cell* yang terlihat adalah *mast cell* yang berada disekitar pembuluh darah. Kubes, *et al* 1993 mengatakan bahwa dengan pewarnaan *safranin*, *mast cell* dapat terlihat secara mikroskopis pada jaringan mesenterium tikus dan berada di perivaskuler (14). Sedangkan Widjanto 2001 mengatakan bahwa *mast cell* dapat terlihat secara mikroskopis dengan pewarnaan *toluidine blue* pada sumsum tulang manusia (15). Dengan demikian *mast cell* dapat terlihat secara mikroskopis baik dengan pewarnaan *safranin* maupun dengan *toluidine blue*.

Pemberian berulang ovalbumin dapat mengaktifasi *mast cell* pada jaringan mesenterium tikus. Ovalbumin merupakan protein alergenik (antigen)

Tabel 1. Efek Karboksimetil Kitosan Terhadap Prosentase Mast Cell Terdegranulasi yang Dipapar dengan Ovalbumin

No	Perlakuan	Rata-Rata (% ± SD)	BJND
1	Kontrol	38,25 ± 2,88	A
2	OVA + KMK 1,00	51,44 ± 1,01	B
3	OVA + KMK 0,50	64,30 ± 0,68	C
4	OVA + KMK 0,25	68,47 ± 1,31	D
5	Alergen/OVA	80,89 ± 2,00	E

Keterangan : Notasi berbeda pada *superscript* menunjukkan beda nyata ($P < 0,01$)

BJND : Beda nyata jarak duncan

yang sering digunakan untuk menginduksi reaksi alergi. Reaksi alergi dapat terjadi melalui tahap-tahap aktivasi sel-sel imunokompeten salah satunya adalah rekrutmen *mast cell*. Ikatan silang antara antigen (alergen) dengan antibodi (IgE) pada membran *mast cell* melalui reseptor IgE (FcεRI) akan terjadi degranulasi *mast cell*. Pemberian ovalbumin pada penelitian ini terjadi peningkatan jumlah prosentase *mast cell* terdegranulasi. Degranulasi *mast cell* dapat terjadi bila antigen diregulasi oleh suatu kompleks seri dari proses signaling intraseluler yang menginisiasi agregasi FcεRI *mast cell*. Agregasi FcεRI mengaktifkan fosforilasi sehingga terjadi sinyal transduksi (16). Selanjutnya Krishnaswamy, *et al* (2001) mengatakan bahwa sinyal transduksi ini berlanjut dengan mengaktifasi *lyn kinase* kemudian memfosforilasi rantai beta dan gamma (5). Syk kinase menjadi teraktivasi, kemudian diikuti oleh keterlibatan fosfolipase C_γ (PLC_γ), *mitogen activated protein kinases* (MAPK) dan fosfoinositol 3 kinase. Pembentukan inositol triphosfat dan diasil gliserol serta *second messenger* lainnya menggiring untuk melepaskan Ca²⁺ intraseluler dan aktivasi kinase C. mobilisasi Ca²⁺ dan aktivasi protein kinase C menyebabkan degranulasi *mast cell*.

Pemberian KMK terbukti menurunkan prosentase degranulasi *mast cell*. Penurunan ini berkaitan dengan sifat KMK yang dapat mengikat ovalbumin.

Liang, *et al* (2008) mengatakan bahwa KMK memiliki kemampuan penyerapan terhadap air, peptide dan sebagai pembawa obat-obat protein (17). Menurut Daroz *et al* 2008, KMK dapat berperan sebagai *carrier biopolymer*, peran ini memungkinkan KMK untuk membawa ovalbumin keluar dari tubuh (18).

Kemungkinan yang lain adalah KMK dapat mengikat ovalbumin melalui ikatan gugus aktifnya (-NH₂ dan COOH). Ovalbumin sebagai antigen memiliki gugus hidrofilik seperti OH, -NH, -NH₂ dan COOH, sehingga melalui ikatan hidrogen atau ikatan peptide membentuk kompleks KMK-ovalbumin (19). Kompleks KMK-ovalbumin masuk ke sel sebagai antigen tidak dapat dipresentasikan oleh APC (*antigen presenting cell*) karena sudah terikat dengan KMK. Baratawidjaya (2006) mengatakan bahwa kadang-kadang antigen ditolak oleh APC mempersentasikan ke sel T. atau bisa dipresentasikan oleh APC bukan antigen spesifik untuk antibodi IgE, melainkan antigen spesifik untuk IgG (1). Karena ketika kompleks KMK-ovalbumin dipresentasikan ke sel T oleh APC terjadi produksi IL-12. Interleukin ini memacu diferensiasi sel T CD4 menjadi sel efektor Th 1 untuk memproduksi interferon gamma dan juga merangsang sel B untuk memproduksi antibodi IgG.

Maeda dan Kimura (2004) mengatakan bahwa kitosan yang larut dalam air yang merupakan sifat dari KMK, dapat mengaktifasi makrofag melalui produksi sitokin interferon gama (20). Peningkatan peranan fagositosis makrofag merupakan cara yang baik untuk meningkatkan respon imun Th1. Sel Th1 memproduksi interferon gama yang mengaktifkan makrofag. Dengan demikian ada hubungan antara KMK dengan respon imun Th1. Dengan kata lain KMK dapat menyebabkan respon imun Th1. Hal ini dapat mencegah peningkatan respon imun Th2 yang disebabkan oleh alergen/ovalbumin. Karena *mast cell* yang merupakan sel efektor dalam reaksi hipersensitifitas tipe 1 sangat berperan penting dalam respon imun Th2. Peningkatan respon imun Th2 pada akhirnya akan menyebabkan alergi dan alergi tersebut merupakan bentuk "*Th2 disease*" yang upaya perbaikannya memerlukan bahan aktif terapi seperti KMK untuk pengembalian pada kondisi Th1-Th2 yang seimbang.

KESIMPULAN

Karboksimetil Kitosan dapat menghambat peningkatan prosentase *mast cell* terdegranulasi pada jaringan mesenterium tikus setelah dipapar dengan alergen (ovalbumin) dapat dihambat oleh KMK. Potensi KMK sebagai anti alergi perlu dilanjutkan dengan penelitian secara invitro.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Baratawidjaya. *Immunologi dasar edisi ke tujuh*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2006
2. Widjanto E. *Mast cell. Fakta dan potensinya dalam perspektif Laboratory Medicine*. Pidato pengukuhan jabatan guru besar dalam bidang Ilmu Patologi Klinik pada Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya Malang, 2007

3. Bellanti JA. *Immunology II*. WB Saunders Company: Philadelphia; 1978;471-490.
4. Abraham SN. & R. Malaviya. *Mast cell in infection and immunity*. Infect Immun. 1997;65:3501-3508.
5. Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, et al. *The Human mast cell: Functions in physiology and disease*. Bioscience. 2001;6:d1109-1127.
6. Kim SM, You HJ, You MK, Kim NS, Sim BS & Kim HM. *Inhibitory effect of water-soluble chitosan on TNF- and IL-8 secretion from HMC-1 cells*. J. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2004;26:401-409.
7. Dwiyoitno, Basmal J, Mulyasari. *Pengaruh Suhu Esterifikasi Terhadap Karakteristik Karboksimetil Kitosan (CMCTs)*. J. Penel. Perik. Indonesia. Edisi Pascapanan. 2004;10(3):67-73.
8. Davies DH, Elson CM, and Hayes ER. *N,O Carboxymethyl Chitosan, A New Water Soluble Chitin Derivative*. In Gudmund Skjak-Braek, Anthonsen, G.T. And Sanford, P. (Eds). Chitin and Chitosan : Elsevier Applied Science; 1989;474
9. Muzzarelli RA, Rocchetti A, Stanic RV, & Weckx M. *Methods for the Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan*. In Muzzarelli, R. A. A and Peter, M. G. (eds.). Chitin Handbook. European Chitin Society. P; 1997;109-132.
10. Zhai M, Yoshii F & Kume. *Studying on Antibacterial Starch/Chitosan Blent Film Formed Under The Action of Irradiation*. J. Carbohydrate Pol; 2003; 52(3):311-317.
11. Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki I, Tokura S & Azuma I. *Immunological activity of chitin and derivatives*. Vaccine. 1984;2:93-99.
12. Hsieh KY, CI Hsu, JY Lin, CC Tsai & RH Lin. *oral administration of an edible-mushrom derived protein inhibit the development of food-allergic reaction in mice*. Clin Exp Allergy. 2003; 33:1595-1602.
13. Morokata T, J Ishikawa & T Yamada. *Antigen dose the defines T helper 1 and T helper 2 responses in the lung of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses*. Immunol Lett. 2000;72:119-126.
14. Kubes P, Kanwar S, Niu XF & Gaboury JP. *Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cell*. FASEB J. 1993;7:1293-1299.
15. Widjajanto E. *Hubungan antara mastosit dengan Hiposelularitas sumsum tulang melalui mediator leukotrien B-4 (LTB-4) dan tumor nekrosis factor- α (TNF- α), penelitian pada aspirat sumsum tulang dari penderita gangguan hematopoisis [Disertasi]*. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga. 2001.
16. Gilfillan AM, & Tkaczyk CH. *Integrated signaling Pathways for mast cell activation*. Nat. Rev. Immunol. 2006;6:218-230
17. Liang X, H Wang, H Tian, H Luo & J Chang. *Synthesis, structure and properties of novel quaternized carboxymethyl chitosan with drug loading capacity*. Acta Physico-Chimica Sinica. 2008;24(2):223-229.
18. Daroz LRD, JB Lopes, LAO Dallan, SP Campanafilho, LFP Moreira & NAG Stolf. *Prevention of postoperative pericardial adhesions using thermal sterile carboxymethyl chitosan*; 2008
19. Subowo *Imunobiologi*. Penerbit Angkasa Bandung; 1993
20. Maeda Y & Yoshiyuki K. *Antitumor Effects of Various Low-Molecular-Weight Chitosans Are Due to Increased Natural Killer Activity of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Sarcoma 180-Bearing Mice*. J. Nutr. 2004;134: 945-950.