

## Efek Pemberian Ekstrak Etanol Buah Mengkudu pada Mencit Setelah Diinfeksi *Toxoplasma gondii* Galur RH

DIDIK T. SUBEKTI<sup>1</sup>, EKA S.P. SARI<sup>2</sup>, DWI R. WIDYASTUTI<sup>2</sup>, RICA HAERLANI<sup>2</sup>, EKA FITRI DIANI<sup>2</sup>, TOLIBIN ISKANDAR<sup>1</sup>, DIAN R. LAKSMITAWATI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jl. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta 12640

(Diterima dewan redaksi 12 Agustus 2005)

### ABSTRACT

SUBEKTI, D.T., E.S.P. SARI, D.R. WIDYASTUTI, R. HAERLANI, E.F. DIANI, T. ISKANDAR and D.R. LAKSMITAWATI. 2005. Effect of methanol extracts of nony fruit on mice infected by RH strain of *Toxoplasma gondii*. *JITV* 10(4): 305-314.

Intraperitoneal infection of Type I *Toxoplasma gondii* on mice causes high mortality at a short time due to parasitic burden, immunosuppression, cell and tissue damage. The mice survival is increased after treated with drugs that reduce or destroy tachyzoite and modulate or recovered the immune system. Nony fruit (*Morinda citrifolia*) is popular as immunomodulator and has antoxoplasma properties. The purpose of this experiment is to evaluate the effect of ethanol extract of nony fruit and Fansidar<sup>®</sup> (pyrimethamine-sulfadiazine) to reduce tachyzoite and improve survival as well as immunomodulator on mice following toxoplasma infection. Mice was divided into six groups (10 mice respectively) consist of infected-non treated groups, infected + Fansidar<sup>®</sup>, infected + ethanol extract of nony on several doses (100, 50, 25%) and non infected-non treated groups. All mice on each groups were infected intraperitoneally by  $5 \times 10^6$  and  $2,5 \times 10^3$  RH strain of *Toxoplasma gondii* tachyzoite/mice respectively. The results have shown that Fansidar<sup>®</sup> was successfully to reduced tachyzoite and improved mice survival but the ethanol extract of nony fruit was failed.

**Key Words:** Survivality, Immunomodulator, *Toxoplasma gondii*, Nony extracts

### ABSTRAK

SUBEKTI, D.T., E.S.P. SARI, D.R. WIDYASTUTI, R. HAERLANI, E.F. DIANI, T. ISKANDAR dan D.R. LAKSMITAWATI. 2005. Efek pemberian ekstrak etanol buah mengkudu pada mencit setelah diinfeksi *Toxoplasma gondii* galur RH. *JITV* 10(4): 305-314.

Infeksi intraperitoneal dengan *Toxoplasma gondii* tipe I menyebabkan kematian yang sangat tinggi dalam waktu sangat singkat. Kematian disebabkan jumlah parasit yang tinggi dalam tubuh, imunosupresi yang parah dan kerusakan jaringan yang luas. Upaya memperbaiki daya hidup dapat dilakukan dengan menggunakan bahan obat yang memiliki potensi mereduksi perkembangan takizoit, memperbaiki respon imun dan mempercepat regenerasi jaringan. Salah satu bahan obat tersebut adalah buah mengkudu. Penelitian dilakukan dengan tujuan mengetahui potensi ekstrak etanol buah mengkudu untuk mereduksi takizoit, mempertahankan daya hidup serta efeknya sebagai imunomodulator pada mencit setelah infeksi toksoplasma. Hewan coba yang digunakan adalah mencit dan dibagi menjadi enam kelompok (10 ekor/kelompok) yaitu diinfeksi tanpa pengobatan, diinfeksi dan diobati dengan Fansidar<sup>®</sup> (pirimetamin-sulfadiazin), diinfeksi dan diobati dengan ekstrak etanol buah mengkudu dosis bertingkat (100, 50 dan 25%) serta kontrol normal. Semua mencit pada setiap kelompok diinfeksi dengan takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH dengan dosis  $5 \times 10^6$  dan  $2,5 \times 10^3$  takizoit/mencit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Fansidar<sup>®</sup> mampu mereduksi takizoit, mempertahankan daya hidup mencit sedangkan ekstrak etanol buah mengkudu tidak berhasil.

**Kata Kunci:** Daya hidup, Immunomodulator, *Toxoplasma gondii*, Ekstrak Mengkudu

### PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii*. Parasit tersebut mampu menginfeksi hampir semua jenis sel berinti (*nucleated cell*) termasuk leukosit pada manusia dan berbagai jenis hewan mamalia darat maupun air (ikan lumba-lumba dan ikan paus), bangsa burung (aves) bahkan serangga (DUBEY, 2002; DUBEY *et al.*, 2002; RESENDES *et al.*, 2002). Penetrasi ke dalam sel target terjadi secara aktif oleh bentuk infeksi dari *Toxoplasma gondii* yaitu takizoit yang memiliki

kemampuan replikasi dengan cepat. Proses penetrasi oleh takizoit ke dalam sel berinti yang menjadi target hanya memerlukan waktu sekitar 15–30 detik (BLACK dan BOOTHROYD, 2000). Sebaliknya pada proses fagositosis yang menyebabkan terjadinya proses penghancuran vakuola fagosom membutuhkan waktu 4 menit (BLACK dan BOOTHROYD, 2000). Kecepatan proses penetrasi yang demikian cepat dibandingkan dengan kemampuan sel memfagositosis menyebabkan sel menjadi tidak teraktivasi dan tidak responsif. Inaktivasi dan hilangnya responsifitas sel fagositik pada saat diinfeksi oleh takizoit juga disebabkan karena

parasit tersebut membentuk suatu vakuola parasitoforus yang tidak dikenali dan tidak dapat mengalami fusi dengan vakuola lisosom sehingga proses penghancuran organisme intraseluler tidak terjadi (MCLEOD *et al.*, 1991; ROBERT dan JANOVY, 2000; COPPENS dan JOINER, 2001). Hal demikian menyebabkan takizoit mampu berkembang biak secara vegetatif dalam sel tersebut.

Apabila takizoit telah berada dalam sel dan berkembang mencapai 64–128 takizoit, maka takizoit akan menghancurkan sel tersebut untuk keluar (*egress*) dan menginfeksi sel lain di sekitarnya (BLACK dan BOOTHROYD, 2000). Proses tersebut akan menyebabkan kerusakan sel yang masih pada berbagai jaringan terutama leukosit dalam sirkulasi darah. Infeksi takizoit dalam darah akan menyebabkan supresi leukosit secara kualitatif maupun kuantitatif. Oleh karena takizoit dapat melumpuhkan komponen sistem imun (leukosit) dan menghancurkannya serta memiliki kemampuan berkembang secara cepat maka diperlukan suatu bahan obat yang mampu mereduksi atau bahkan membunuh takizoit (antiprotozoa) secara cepat. Regenerasi jaringan yang rusak akibat infeksi *Toxoplasma gondii* juga diperlukan untuk memulihkan fungsi jaringan atau organ, terutama leukosit sebagai komponen sistem imun natural dan adaptif. Diharapkan dengan mereduksi atau membunuh takizoit dan meregenerasi komponen sistem imun tersebut daya hidup mencit dapat ditingkatkan.

Salah satu obat yang menjadi pilihan utama penanganan toksoplasmosis adalah pirimetamin yang diketahui memiliki efek antitoksoplasma. Namun, pirimetamin memiliki efek samping berupa leukositopenia dan teratogenik. Efek samping tersebut menyebabkan penggunaan pirimetamin sangat tidak sesuai dan beresiko bagi wanita hamil. Di sisi lain secara tradisional terdapat tanaman obat yang dilaporkan memiliki kemampuan untuk mengobati toksoplasmosis. Bahan alternatif yang dilaporkan dapat mereduksi takizoit *Toxoplasma gondii* adalah buah Mengkudu (KUMOLOSA, pers. comm.). Tanaman obat tersebut juga telah dilaporkan mampu bertindak sebagai

imunomodulator dan meregenerasi sel-sel yang rusak (WAHA, 2002). Meskipun demikian efek penggunaan kedua bahan obat tersebut secara nyata terhadap perubahan atau pola respon imun humoral yang secara spesifik diperantarai antibodi pada kasus toksoplasmosis belum diketahui dengan jelas. Berdasarkan latar belakang tersebut pada penelitian ini ingin diketahui kemampuan ekstrak etanol buah mengkudu terhadap reduksi takizoit, daya hidup dan efek imunomodulasi pada mencit yang diinfeksi *Toxoplasma gondii*.

## MATERI DAN METODE

### Desain percobaan

Percobaan I dilakukan untuk mengetahui efek pemberian Fansidar® (pirimetamin-sulfadiazin) dan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu terhadap infeksi secara akut dengan dosis tinggi pada mencit. Infeksi secara akut dengan dosis tinggi dilakukan dengan memberikan infeksi intraperitoneal  $5 \times 10^6$  takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH/ekor mencit BALB/c (umur 7–8 minggu). Pada infeksi dosis tinggi diharapkan akan dapat diketahui efek infeksi takizoit terhadap mortalitas dan perkembangan takizoit dalam waktu yang singkat.

Percobaan II dilakukan sebagai lanjutan dari percobaan I dengan desain berbeda. Tujuan percobaan II untuk melihat efek pemberian Fansidar® dan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu terhadap infeksi akut dengan dosis rendah. Infeksi intraperitoneal dosis rendah menggunakan  $2,5 \times 10^3$  takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH/ekor mencit BALB/c (umur 7–8 minggu). Pemberian dosis rendah dimaksudkan agar mencit dapat bertahan lebih lama sehingga respon imun dapat terstimulasi relatif lebih panjang dibandingkan dengan percobaan I. Pemberian obat dilakukan setelah takizoit dalam peritoneum telah berkembang menjadi  $10^5$  takizoit/ekor mencit sehingga awal pengobatan pada percobaan I dan II dilakukan pada saat takizoit mencapai jumlah yang cukup tinggi.

**Tabel 1.** Ringkasan pembagian kelompok perlakuan pada percobaan I maupun percobaan II

Kode	Infeksi	Pengobatan	
I (Kontrol negatif)	+	–	Infeksi
II (Kontrol positif)	+	+	Fansidar
III (Mengkudu 100 %)	+	+	MKD 1
IV (Mengkudu 50 %)	+	+	MKD 2
V (Mengkudu 25 %)	+	+	MKD 3
VI (Normal)	–	–	Normal

Secara keseluruhan, tujuan percobaan adalah untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak etanol buah mengkudu berdampak pada perpanjangan umur mencit dan berpotensi mengurangi efek immunosupresi khususnya akibat destruksi sel-sel yang terinfeksi secara *in vivo*. Waktu pengobatan diantara kedua percobaan tersebut juga dilakukan pada saat parasit telah mencapai jumlah yang relatif sama tinggi. Hal tersebut diharapkan dapat memberikan informasi apakah bahan obat tersebut memiliki kemampuan yang sama dalam mereduksi takizoit apabila diaplikasikan pada waktu yang berbeda.

### Hewan coba dan parasit

Hewan coba yang digunakan adalah mencit BALB/c yang diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner Bogor. Mencit yang digunakan berusia sekitar 6–7 minggu sebanyak 55 ekor untuk masing-masing percobaan. Pembagian kelompok dalam masing-masing percobaan diringkas dalam Tabel 1. Takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH diperoleh dari PAU Bioteknologi UGM atas izin Dr. Wayan T. Artama dan dirawat (*maintenance*) di Balai Penelitian Veteriner Bogor.

### Pirimetamin dan ekstraksi buah mengkudu

Dosis pirimetamin ditentukan berdasarkan kandungan atau ketersediaan bahan tersebut dalam preparat Fansidar® (Roche). Pirimetamin digunakan sebagai antitoksoplasma karena bahan obat tersebut merupakan obat pilihan utama untuk kasus toksoplasmosis pada manusia maupun hewan. Dosis pirimetamin yang digunakan adalah 5,25 mg/kg bobot hidup (HAYTON *et al.*, 2002).

Ekstraksi buah mengkudu dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta. Buah mengkudu dicuci dan direndam dalam air mendidih kemudian ditiriskan dan dibiarkan sampai lunak. Selanjutnya buah mengkudu dihancurkan sampai diperoleh massa seperti bubur. Proses selanjutnya dilakukan maserasi dengan menggunakan etanol 96% selama 24 jam. Filtrat kemudian disaring dan dimaserasi kembali dengan etanol 96% selama 24 jam. Filtrat yang diperoleh kemudian disaring serta diuapkan dalam rotavapor. Filtrat yang pekat kemudian digunakan sebagai bahan dasar obat.

### Pengamatan dan pengambilan sampel

Pengamatan daya hidup (*survivalitas*) dilakukan sejak dimulai infeksi dan dihentikan setelah kelompok I mengalami kematian menyeluruh ( $LD_{100}$ ). Pengambilan sampel dilakukan setelah hewan percobaan mulai menunjukkan gejala klinis yang parah atau apabila sebagian besar sudah mulai mengalami kematian. Hal

ini disebabkan karena pada kasus toksoplasmosis akibat infeksi oleh *Toxoplasma gondii* tipe I pada mencit umumnya mengakibatkan kematian menyeluruh sehari setelah gejala klinis muncul.

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara eutanasi menggunakan eter. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah dari jantung menggunakan antikoagulan heparin. Darah digunakan untuk pemeriksaan jumlah hitung leukosit, hitung jenis leukosit (*differential count*) dan pengukuran antibodi dari plasma darah. Data hitung jenis leukosit tidak ditampilkan pada makalah ini. Takizoit direisolasi dari rongga peritoneum untuk penghitungan jumlah takizoit intraperitoneal.

### Penghitungan jumlah leukosit dan pengukuran antibodi

Darah yang diperoleh dihitung jumlah leukositnya dengan menggunakan hemositometer *Neubauer Improved Chamber* dan dinyatakan dalam satuan  $10^3$  sel/mm<sup>3</sup>. Pewarna yang digunakan untuk penghitungan jumlah leukosit adalah Pewarna Turk.

Antibodi atau imunoglobulin (IgM dan IgG) diukur dengan menggunakan teknik ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Protein ESA (*excretory secretory antigen*) dilapiskan pada Mikroplat (*Flat bottomed*; Nunc Int., Denmark) dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam 0,05 M sodium karbonat *buffer* (pH 9,8) selama semalam pada 4°C. Pencucian pertama dilakukan hanya menggunakan 0,01 M PBS (pH 7,2) sedangkan pencucian pada masing-masing tahap berikutnya menggunakan PBS-Triton x 100 (0,05%). Prosedur ELISA pada tahap berikutnya dilakukan mengikuti metode yang dilakukan oleh DEBARD *et al.* (1996) dengan beberapa modifikasi.

Konjugat yang digunakan adalah *goat anti-mouse* IgM, µ *chain specific-alkaline phosphatase* (Sigma Chem., USA) dan *goat anti-mouse* IgG, γ *chain specific-alkaline phosphatase* (Sigma Chem., USA). Adapun substrat yang digunakan adalah p-nitrofenilfosfat (Sigma Chem., USA). Hasil pengukuran dibaca menggunakan *ELISA Reader* pada filter 405 nm. Nilai kerapatan optik (OD) dikonversi menjadi titer antibodi dengan menggunakan kurva baku titer. Titer dinyatakan dalam satuan “ng/µL plasma darah”. Kurva baku ditetapkan dengan menggunakan rentang konsentrasi antara 0,00001–0,05 µg/lubang mikroplat.

### Reisolasi dan penghitungan takizoit intraperitoneal

Reisolasi dilakukan dengan cara menyuntikkan 5–10 mL PBS ke dalam rongga peritoneum. Selanjutnya cairan diaspirasi dan ditampung dalam tabung sentrifus konikal. Cairan disentrifus pada 3000 rpm selama 10 menit dalam temperatur 4°C. Supernatan hasil sentrifus dibuang sedangkan pelet diresuspendi dalam 1 mL PBS

dan dihitung jumlah takizoitnya menggunakan *Naubauer Improved Chamber*. Jumlah hitung takizoit dinyatakan dalam  $10^3$  takizoit per mL atau per mencit.

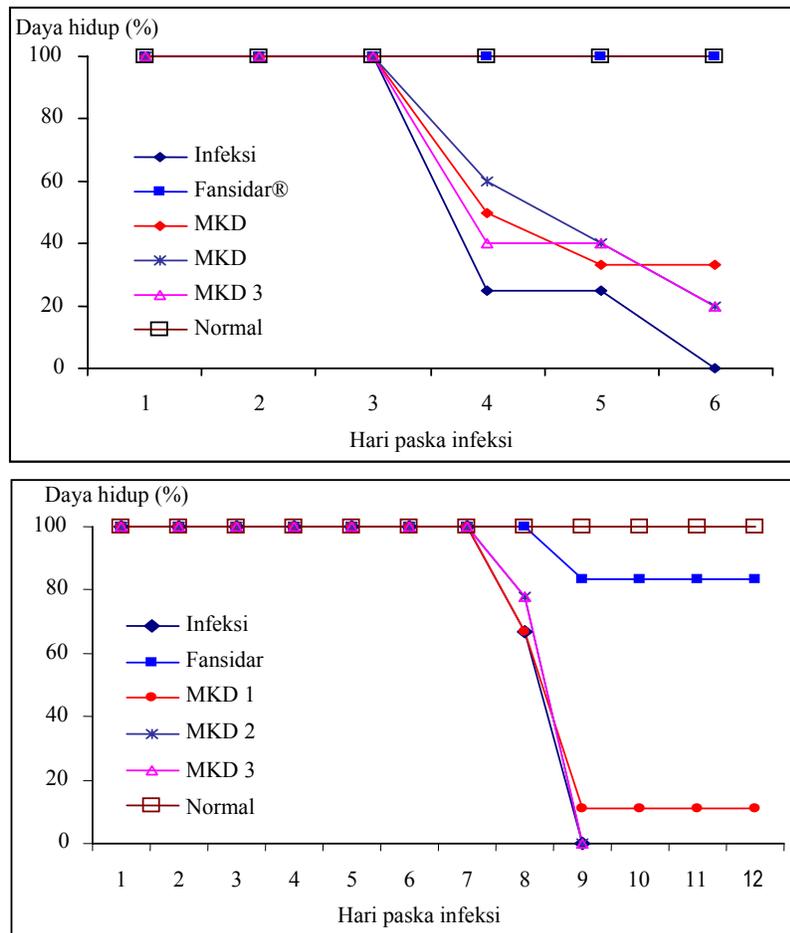
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Daya hidup mencit

Hasil penelitian pada percobaan I dan II terhadap daya hidup mencit ditampilkan pada Gambar 1. Perbedaan dosis infeksi pada masing-masing percobaan menghasilkan dinamika daya hidup mencit yang berbeda. Perbedaan tersebut terjadi pada semua kelompok perlakuan yang diinfeksi tanpa maupun dengan pengobatan.

Semakin tinggi dosis infeksi pada mencit maka waktu kematian menyeluruh ( $LD_{100}$ ) menjadi semakin

singkat. Pada infeksi dengan dosis  $10^3$  takizoit per mencit (Percobaan II), maka kematian menyeluruh mulai terjadi pada hari ke-9 paska infeksi (Gambar 1B). Hasil tersebut serupa dengan NGUYEN *et al.* (2003) yang menggunakan galur RH pada dosis  $10^2$  takizoit/mencit. Sebaliknya apabila mencit diinfeksi dengan dosis tinggi  $10^6$  takizoit per mencit (Percobaan I) maka kematian terjadi lebih singkat yaitu hari ke-5 paska infeksi. Pada infeksi dengan dosis  $10^3$  takizoit per mencit, perpanjangan usia hidup sesungguhnya terjadi pada hari ke-4 paska infeksi. Hal ini disebabkan pada masa tersebut takizoit yang diinfeksi secara intraperitoneal sedang mengalami multiplikasi. Pada hari ke-4 atau ke-5 paska infeksi, penghitungan jumlah takizoit dalam cairan peritoneum telah menunjukkan  $10^5$  takizoit per mencit.



**Gambar 1.** Daya hidup mencit BALB/c setelah infeksi intraperitoneal dengan takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH. Infeksi Intraperitoneal dengan dosis  $5 \times 10^6$  takizoit/ekor mencit (Percobaan I); Infeksi dilakukan pada hari pertama dan langsung diikuti dengan pengobatan; Infeksi intraperitoneal dengan dosis  $2,5 \times 10^3$  takizoit/ekor mencit (Percobaan II); Pengobatan dilakukan empat hari paska infeksi setelah takizoit intraperitoneal mencapai  $10^5$  takizoit/ekor mencit

Penghitungan waktu terjadinya kematian mencit pada percobaan II dimulai dari hari ke-5 sampai kematian menyeluruh (hari ke-9) terjadi sekitar 4–5 hari. Interval waktu tersebut serupa dengan interval waktu yang dicapai oleh infeksi intraperitoneal dengan dosis  $10^6$  pada percobaan I. Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa pada infeksi takizoit *Toxoplasma gondii* tipe I secara intraperitoneal pada dosis  $10^6$  per mencit umumnya akan mengakibatkan kematian menyeluruh pada hari ke 4–5 paska infeksi (NGUYEN *et al.*, 2003). Bukti ini memperlihatkan bahwa secara umum apabila dalam tubuh mencit (rongga peritoneum) jumlah takizoit toksoplasma tipe I telah mencapai jumlah  $10^5$ - $10^6$  maka 4–5 hari berikutnya akan terjadi kematian. Hal ini disebabkan karena takizoit dari toksoplasma tipe I memiliki kemampuan menyebar dalam jarak yang jauh dan bereplikasi sangat cepat (BARRAGAN dan SIBLEY, 2002). Akibatnya, jika suatu bahan gagal mereduksi takizoit secara cepat maka kematian secara cepat pada mencit tidak dapat dihindari.

Kematian pada mencit akibat infeksi toksoplasma tipe I tidak hanya terkait dengan kerusakan jaringan yang mengakibatkan gangguan dan bahkan kegagalan fungsi organ. Kematian pada mencit oleh infeksi toksoplasma tipe I juga dipicu oleh produksi yang sangat berlebihan beberapa sitokin proinflamatorik seperti IL 12, IL 18, IFN $\gamma$  dan TNF $\alpha$  (SIBLEY *et al.*, 2002). Sekresi yang sangat berlebihan dari sitokin proinflamatorik tersebut berdampak detrimental pada organ tubuh karena justru menyebabkan terjadinya kerusakan dan gangguan fungsi normal. Dengan demikian kematian pada mencit tidak hanya dipicu oleh takizoit semata tetapi juga disebabkan oleh respon imun yang berlebihan sehingga merusak jaringan tubuh itu sendiri.

Walaupun terdapat kesamaan interval waktu kematian mencit setelah jumlah takizoit dalam rongga peritoneum mencapai  $10^5$ - $10^6$  per mencit, tetapi penundaan waktu pengobatan akan memiliki implikasi yang berbeda terhadap daya hidup mencit. Berdasarkan Gambar 1 terlihat bahwa perbedaan waktu pemberian Fansidar<sup>®</sup> pada percobaan I dan II memberikan implikasi yang berbeda. Penundaan pengobatan dengan Fansidar<sup>®</sup> pada percobaan II mengakibatkan kematian mencit sekitar 20%. Peristiwa tersebut disebabkan karena takizoit telah mengalami perkembangan dan penyebaran selama masa 4 hari pertama sejak diinfeksi. Pengobatan yang dilakukan setelah terjadinya penyebaran yang lebih luas dan perkembangan takizoit tersebut akan mengurangi peluang daya hidup mencit secara kelompok maupun individual.

Penggunaan ekstrak etanol buah mengkudu juga tidak mampu memberikan proteksi yang signifikan

(Gambar 1), baik pada percobaan I maupun II. Pada percobaan I meskipun terdapat sejumlah mencit yang bertahan hidup pada pemberian ekstrak etanol buah mengkudu namun penghitungan terhadap jumlah takizoit intraperitoneal menunjukkan angka yang cukup tinggi ( $10^7$  takizoit/mencit). Pada jumlah takizoit yang demikian tinggi dalam rongga peritoneum, diperkirakan mencit hanya dapat bertahan paling lama 2 hari. Hal ini berarti tidak akan ditemukan mencit yang bertahan hidup pada hari ke-6 atau ke-7.

Kondisi tersebut berbeda dengan perlakuan menggunakan Fansidar<sup>®</sup> karena seluruh mencit yang bertahan hidup tidak menunjukkan adanya takizoit dalam peritoneum maupun dalam pemeriksaan ulas darah. Sebaliknya pada percobaan II, meskipun dalam kelompok MKD I terdapat mencit yang bertahan hidup (11%) dan pemeriksaan takizoit intraperitoneal menunjukkan hasil negatif (tidak ditemukan adanya takizoit) namun tingkat keberhasilannya sangat rendah (<15%). Hal ini memperlihatkan bahwa efek reduksi ekstrak etanol buah mengkudu terhadap takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH sangat kecil. Namun demikian tidak berarti secara mutlak bahwa ekstrak tersebut tidak bermanfaat. Hal ini perlu digarisbawahi mengingat proses ekstraksi belum mencapai tingkat purifikasi bahan aktif dan belum diuji coba pada toksoplasma tipe II, III, IV dan V yang memiliki karakter dan patogenitas yang sangat berbeda dengan tipe I.

### Jumlah takizoit peritoneum

Hasil reisolasi takizoit dari rongga peritoneum menunjukkan bahwa jumlah takizoit yang diberi perlakuan dengan ekstrak etanol buah mengkudu tidak mengalami penurunan yang signifikan ( $P>0,05$ ) dan bahkan beberapa justru mengalami peningkatan (Tabel 2). Secara keseluruhan fenomena tersebut memperkuat bukti bahwa ekstrak etanol buah mengkudu tidak memiliki aktivitas anti toksoplasma terhadap takizoit toksoplasma tipe I khususnya *Toxoplasma gondii* galur RH. Kondisi yang berbeda justru terjadi pada pemberian Fansidar<sup>®</sup> yang mampu mereduksi takizoit secara sempurna. Hal ini terjadi karena pirimetamin mampu membunuh takizoit yang kemudian akan difagositosis oleh sel fagositik untuk dibersihkan (*clearance*). Di sisi lain proses fagositosis oleh sel fagositik juga akan menginisiasi stimulasi sistem imun terutama pada organ limfoid sekunder. Inisiasi tersebut terutama dilakukan oleh monosit yang dapat bertindak sebagai sel penyaji antigen (APC = *antigen presenting cell*).

**Tabel 2.** Rataan jumlah takizoit dan sel peritoneum ( $\times 10^7$ ) pada mencit

	Jumlah takizoit dalam peritoneum	Jumlah sel peritoneal
Percobaan I		
(pengambilan sampel hari ke – 4 paska infeksi)		
Infeksi	2,196 <sup>a</sup>	0,160
Fansidar®	0 <sup>c</sup>	0,341
MKD 1	1,643 <sup>a</sup>	0,040
MKD 2	1,285 <sup>a</sup>	0,120
MKD 3	4,496 <sup>b</sup>	0,320
Percobaan II		
(pengambilan sampel hari ke – 8 paska infeksi)		
Infeksi	1,716 <sup>a</sup>	0,248
Fansidar®	0 <sup>c</sup>	0,533
MKD 1	5,632 <sup>b</sup>	0,016
MKD 2	2,507 <sup>ab</sup>	0,133
MKD 3	1,216 <sup>a</sup>	0,027
Normal	0	0,200

Superskrip a, b, c yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )**Respon imun terhadap ESA Takizoit**

Berdasar pada Gambar 2A. terlihat bahwa respon imun yang muncul pada percobaan I adalah IgM sedangkan IgG belum terdeteksi. Hal ini sangat wajar mengingat IgM mulai dapat dideteksi pada 3–4 hari paska infeksi sedangkan IgG umumnya mulai dapat dideteksi sekitar 7–8 hari paska infeksi atau paparan imunogen (ABBAS *et al.*, 2000). Namun demikian pada Gambar 2B terlihat bahwa sebagian besar IgG juga belum terdeteksi meskipun sampel diperoleh pada hari ke 8 paska infeksi. IgG hanya terdeteksi pada beberapa mencit dari kelompok yang diinfeksi (1 dari 3 ekor yang dibunuh) dengan titer 1,083 ng/ $\mu$ L plasma. Sebagian besar mencit lainnya pada kelompok infeksi, Fansidar® dan MKD 1 sebenarnya telah menunjukkan respon IgG yang positif namun masih rendah. Oleh karena nilai kerapatan optik positifnya yang rendah maka saat dikonversi secara kuantitatif menjadi nol ( $\sim 0$ ). Berdasar hasil tersebut maka diduga tingginya titer IgG pada satu ekor mencit dari kelompok yang diinfeksi tersebut lebih cenderung sebagai respon individual mencit.

Rendahnya respon IgG terhadap ESA pada kelompok lain terutama kelompok Fansidar® pada percobaan II kemungkinan disebabkan oleh adanya immunosupresi akibat destruksi leukosit oleh takizoit maupun matinya takizoit. Indikasi adanya immunosupresi juga terlihat dari berat limpa dan jumlah splenosit pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan yang

normal (Data tidak ditampilkan). Faktor utama yang menyebabkan rendah atau tertundanya titer IgG terhadap protein ESA pada perlakuan menggunakan Fansidar® kemungkinan berkaitan dengan matinya takizoit sehingga sekresi protein ESA menjadi sangat minimal (hanya di awal infeksi). Hal ini disebabkan karena protein ESA hanya dapat diproduksi apabila takizoit masih hidup dan sedang aktif melakukan penetrasi ke dalam sel. Kenyataan demikian terbukti dengan adanya respon IgG anti SPTAg yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya apabila antigen yang digunakan dalam ELISA adalah SPTAg atau protein solubel takizoit *Toxoplasma gondii* (Data tidak ditampilkan).

Sebaliknya, munculnya IgM pada semua kelompok perlakuan merupakan konsekuensi logis dari dua faktor. Pertama, kasus infeksi pada mencit tersebut merupakan kasus akut meskipun pada percobaan II terdapat perpanjangan masa hidup. Oleh sebab itu pada fase awal infeksi akan senantiasa berkaitan dengan IgM. Kedua, IgM pada hakikatnya merupakan reseptor permukaan pada limfosit B (*IgM bearing membrane*) yang berfungsi mengenali antigen (ABBAS *et al.*, 2000). Apabila antigen dikenali dan bertemu dengan IgM terikat membran limfosit B maka antigen-IgM akan diinternalisasi dan diproses melalui jalur MHC II untuk dipresentasikan pada sel T. Interaksi antara limfosit B dengan limfosit T secara kognat (*cognate interaction*) akan menginisiasi terjadinya aktivasi dan diferensiasi limfosit B. Konsekuensi logis lain dari interaksi Ag-

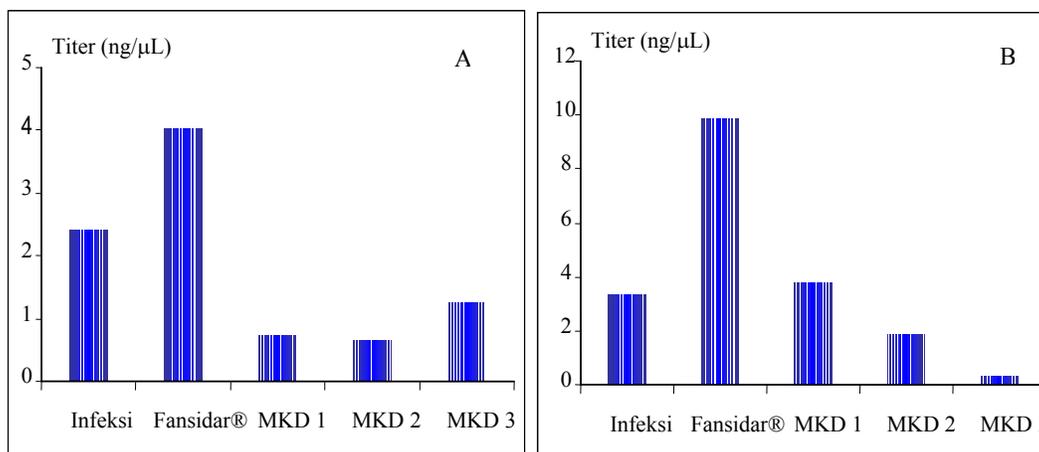
IgM adalah terjadinya kaskade sinyal intraseluler dalam limfosit B untuk mulai proses aktivasi dan diferensiasi tanpa harus menunggu aktivasi limfosit T.

Pada proses aktivasi limfosit B terjadi mekanisme *switching* yang menginisiasi regulasi pembentukan klas imunoglobulin. Pada kasus dimana aktivasi tanpa disertai sinyal dari limfosit T maka proses regulasinya adalah *switching* IgM membran menjadi IgM sekretorik. Diduga pada infeksi akut toksoplasmosis hal ini muncul di fase awal infeksi. Sebaliknya apabila regulasi *switching* disertai dengan sinyal dari limfosit T maka akan disertai pembentukan subklas imunoglobulin lainnya (IgM, IgG, IgA, IgE) tergantung sitokin yang mempengaruhinya. Adapun pembentukan IgG tergantung beberapa faktor utama, diantaranya keberhasilan aktivasi dan diferensiasi menjadi sel plasma serta sinyal induksi oleh sitokin yang dihasilkan oleh limfosit T atau sel penyaji antigen lainnya yang bermigrasi menuju limpa. Apabila limfosit B yang teraktivasi berproliferasi dan berdiferensiasi diinfeksi oleh takizoit maka akan terjadi kegagalan pembentukan antibodi baik IgM (yang diproduksi oleh sel plasma) maupun IgG. Kondisi demikian menyebabkan titer dan profil IgG tidak selalu berbanding lurus dengan profil dan titer IgM. IgM dapat terbentuk sebagai respon langsung dari limfosit B tanpa harus melibatkan sinyal lain (misalnya sitokin dan interaksi kognat dengan sel T).

Titer IgM tertinggi terlihat pada kelompok Fansidar® dibandingkan dengan kelompok lainnya, baik pada percobaan I maupun II. Tingginya titer IgM pada kelompok Fansidar® disebabkan adanya pirimetamin yang bersifat toksoplasmasidal pada stadium takizoit sehingga takizoit tidak berkembang biak. Kemampuan

pirimetamin sebagai obat pilihan utama dalam membunuh takizoit *Toxoplasma gondii* telah dilaporkan oleh beberapa peneliti diantaranya adalah GROSS dan POHL (1996), DEROUIN dan SANTILLANA-HAYAT (2000) dan KHAN *et al.* (2001). Oleh karena takizoit yang mati tetap dapat bertindak sebagai antigen maka IgM tetap dapat menginduksi aktivasi limfosit B. Limfosit B yang telah teraktivasi juga dapat bertindak sebagai sel penyaji antigen (APC = *antigen presenting cell*) bersama sel fagositik lainnya (monosit dan sel dendritik) untuk menginisiasi populasi limfosit lain dalam organ limfoid tersebut agar teraktivasi. Aktivasi dalam limpa sangat diperlukan untuk inisiasi respon imun adaptif humoral maupun seluler yang lebih tinggi, baik IgM maupun IgG. Oleh karena inisiasi dilakukan oleh APC yang mengolah takizoit yang telah mati maka respon imun yang muncul terhadap SPTAg akan lebih dominan dibanding ESA.

Takizoit ekstraseluler yang mati atau gagal melakukan penetrasi ke dalam sel akan diikat atau berikatan dengan IgM pada permukaan limfosit B dan menginduksi aktivasi maupun diferensiasi menjadi sel plasma untuk menghasilkan IgM sekretorik. Meskipun pada kelompok lain mekanisme serupa juga terjadi namun jumlah takizoit yang hidup dalam tubuh masih cukup tinggi dan berkembang biak sehingga akan menghancurkan limfosit dalam sirkulasi darah maupun limpa. Di sisi lain infeksi takizoit pada leukosit terutama monosit dan sel dendritik akan menyebabkan penurunan fungsi (*down regulation*) sel tersebut sebagai APC sehingga tidak dapat mengaktivasi limfosit (WEI *et al.*, 2002). Hal tersebut berdampak pada respon imun yang tidak optimal sehingga produksi IgM maupun IgG oleh limfosit mengalami reduksi ataupun penundaan.



**Gambar 2.** Respon imun (IgM) pada Mencit BALB/c setelah infeksi intraperitoneal takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH dengan dan tanpa pengobatan

Titer IgM (ng/μL plasma) terhadap protein ESA pada Percobaan I; Sampel diambil pada hari ke-4 dan pada hari ke-5 atau ke-6 seluruh mencit kelompok infeksi mengalami kematian; Titer IgM (ng/μL plasma) terhadap protein ESA pada percobaan II. Sampel diambil pada hari ke-8, dan pada hari ke-9 telah mengalami kematian menyeluruh

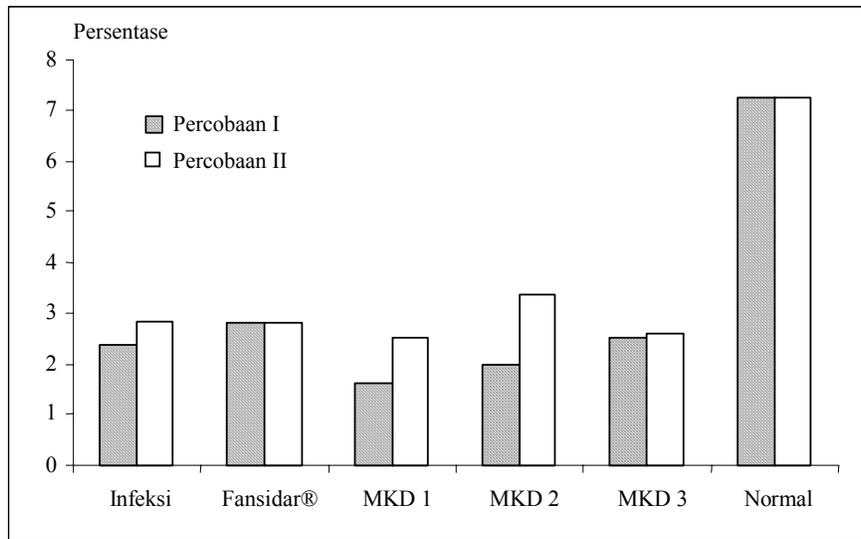
### Efek imunomodulasi pada leukosit

Pengertian imunomodulasi mengandung tiga makna yaitu peningkatan respon imun (*immunoenhancement*), penurunan respon imun (*immunosuppression*) atau respon imun tidak berubah (ELGERT, 1996). Respon imun merupakan reaksi integratif dari sistem imun, baik sistem imun natural maupun adaptif. Masing-masing sistem imun tersebut terdiri atas komponen seluler maupun humoral. Komponen seluler dari sistem imun natural maupun adaptif adalah sel-sel fagositik dan limfosit serta sel pembunuh alamiah (*natural killer cell*). Adapun komponen humoral dari sistem imun natural maupun adaptif diantaranya berupa kompleman dan antibodi (imunoglobulin).

Pada perlakuan dengan ekstrak etanol buah mengkudu ternyata tidak terjadi imunomodulasi positif (*immunoenhancement*, *immunopotentialiation*, *immunostimulation*) seperti yang diharapkan bahkan menyebabkan imunomodulasi negatif (*immunosuppression*). Infeksi takizoit secara tunggal telah menyebabkan terjadinya immunosupresi yang ditandai dengan rendahnya leukosit (Gambar 3) dibandingkan dengan mencit normal. Adanya infeksi takizoit pada sistem sirkulasi darah akan dominan menginfeksi sel dendritik, monosit, neutrofil dan limfosit. Menurut CHANON *et al.* (2000), sel dendritik dan monosit merupakan sel yang sangat permisif

diinfeksi oleh takizoit diikuti dengan neutrofil dan sebagian kecil limfosit. Terinfeksi sel-sel tersebut berakibat pada lumpuhnya fungsi sel sebagai sel fagositik dalam pertahanan awal (neutrofil dan monosit) maupun sebagai APC (sel dendritik dan monosit) serta sel efektor (limfosit) sehingga inisiasi respon imun terhambat. Kompensasinya, limfosit B akan memainkan peran ganda sebagai efektor respon imun humoral sekaligus sebagai APC.

Pemberian ekstrak etanol buah mengkudu juga tidak berhasil mereduksi immunosupresi. Bahkan pada percobaan I, immunosupresi karena infeksi takizoit yang secara aditif berinteraksi dengan pemberian ekstrak etanol buah mengkudu justru sangat parah dibandingkan dengan lainnya (Gambar 3). Hal tersebut terutama terlihat pada percobaan I untuk kelompok MKD 1 dan MKD 2. Penjelasan mengenai fenomena tersebut belum sepenuhnya diketahui tetapi diduga kuat terkait dengan jumlah takizoit yang tinggi (Tabel 2) dan reduksi dosis ekstrak etanol buah mengkudu. Pada percobaan II juga tidak menunjukkan adanya perubahan yang nyata terhadap jumlah hitung leukosit pada pemberian ekstrak etanol buah mengkudu. Bukti tersebut mempertegas bahwa efek imunomodulasi positif dari buah mengkudu (dalam hal ini ekstrak etanolnya) tidak terbukti jika diaplikasikan untuk pengobatan pada infeksi *Toxoplasma gondii* tipe I.



**Gambar 3.** Jumlah hitung leukosit pada mencit BALB/c setelah infeksi intraperitoneal dengan takizoit *T. gondii* galur RH  
\* menunjukkan beda nyata ( $P < 0,05$ ) pada uji BNT

Pada pemberian Fansidar® juga tidak terjadi peningkatan jumlah leukosit meskipun telah terjadi eliminasi takizoit yang sangat nyata. Hal ini menunjukkan bahwa efek deplesi leukosit terjadi sangat singkat dan cepat setelah terjadi infeksi. MORDUE *et al.* (2001) menyatakan bahwa pengamatan pada hari kedua paska infeksi ternyata telah menunjukkan adanya takizoit dalam darah dengan jumlah sangat tinggi. Infeksi tersebut menggunakan *Toxoplasma gondii* galur RH dengan dosis  $10^2$  takizoit secara intraperitoneal. Bahkan menurut BARRAGAN dan SIBLEY (2002) takizoit dari *Toxoplasma gondii* tipe I dapat mencapai sistem sirkulasi darah dalam waktu 12 jam paska infeksi. Fakta yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa pengobatan Fansidar® pada mencit yang diinfeksi dosis tinggi (percobaan I) maupun dosis rendah (percobaan II) memperlihatkan derajat leukositopenia yang sama. Kenyataan demikian membuktikan bahwa efek deplesi leukosit pada percobaan I dan II lebih dominan disebabkan takizoit sebelum seluruh takizoit dibunuh oleh pirimetamin dalam Fansidar®.

### KESIMPULAN

Infeksi takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH parasit yang sangat patogen dan menyebabkan terjadinya immunosupresi serta kematian dalam kurun waktu singkat. Pemberian ekstrak etanol buah mengkudu tidak mampu meningkatkan peluang dan daya hidup mencit BALB/c setelah diinfeksi dengan takizoit *Toxoplasma gondii* galur RH. Efek imunomodulasi positif dari mengkudu tidak terbukti dalam penelitian ini bahkan memperlihatkan efek imunomodulasi negatif (immunosupresi). Sebaliknya pemberian Fansidar® mampu mereduksi sempurna takizoit dan memberikan efek positif bagi respon imun humoral khususnya IgM terhadap protein ESA.

### DAFTAR PUSTAKA

ABBAS, A.K., A.H. LICHTMAN and J.S. POBER. 2000. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

BARRAGAN, A. and L.D. SIBLEY. 2002. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* 195: 1625–1633.

BLACK, M.W. and J.C. BOOTHROYD. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 607–623.

CHANON, J.Y., R.M. SEGUIN and L.H. KASPER. 2000. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect. Immunol.* 68: 4822–4826.

COPPENS, I. and K.A. JOINER. 2001. Parasite–host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention?. *Expert Rev. Mol. Med.* pp. 1–20.

DEBARD, N., D. BUZONI-GATEL and D. BOUT. 1996. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect. Immun.* 64: 2158–2166.

DEROUIN, F. and M. SANTILLANA-HAYAT. 2000. Anti *Toxoplasma* activities of antiretroviral drugs and interactions with pyrimethamine and sulfadiazine *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2575–2577.

DUBEY, J.P. 2002. A Review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet. Parasitol.* 106: 121–153.

DUBEY, J.P., D.H. GRAHAM, C.R. BLACKSTON, T. LEHMANN, S.M. GENNARI, A.M.A. RAGOZO, S.M. NISHI, S.K. SHEN, O.C.H. KWOK, D.E. HILL and P. THULLIEZ. 2002. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: Unexpected findings. *Int. J. Parasitol.* 32: 99–105.

ELGERT, K.D. 1996. Immunology: Understanding The Immune System. Willey–Liss, Inc. New York. pp. 370–388.

GROSS, U and F. POHL. 1996. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii*. GROSS (Ed.). Springer–Verlag, Berlin. pp. 183–195.

HAYTON, K., L.C. RANFORD-CARTWRIGHT and D. WALLIKER. 2002. Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2482–2489.

KHAN, A.A., R.F. SLIFER, F.G. ARAUJO and J.S. REMINGTON. 2001. Activity of *Gatifloxacin* alone or in combination with pyrimethamine or gamma interferon against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 48–51.

MCLEOD, R., D. MACK and C. BROWN. 1991. *Toxoplasma gondii*—new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* 72: 109–121.

MORDUE, D.G., F. MONROY, M.L. REGINA, C.A. DINARELLO and L.D. SIBLEY. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of th 1 cytokines. *J. Immunol.* 167: 4574–4584.

NGUYEN, T.D., G. BIGAIGNON, D. MARKINE-GORIAYNOFF, H. HEREMANS, T.N. NGUYEN, G. WARNIER, M. DELMEE, M. WARNY, S.F. WOLF, C. UYTENHOVE, J.V. SNICK and J.P. COUTELIER. 2003. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes proinflammatory cytokines IL 12 and  $\gamma$ -interferon. *J. Med. Microbiol.* 52: 869–876.

RESENDES, A.R., S. ALMERIA, J.P. DUBEY, E. OBON, C. JUAN-SALLES, E. DEGOLLADA, F. ALEGRE, O. CABEZON, S. PONT and M. DOMINGO. 2002. Disseminated toxoplasmosis in a mediterranean pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with tranplacental fetal infection. *J. Parasitol.* 88: 1029–1032.

- ROBERT, L.S. and J. JANOVY. 2000. Foundations of Parasitology. McGraw Hill, Boston. pp. 127–132.
- SIBLEY, L.D., D.G. MORDUE, C. SU, P.M. ROBBEN and D.K. HOWE. 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 357: 81–88.
- WAHA, M.G. 2002. Sehat dengan Mengkudu. *Ren Media*, Jakarta.
- WEI, S., F. MARCHES, J. BORVAK, W. ZOU, J. CHANNON, M. WHITE, J. RADKE, M-F. CESBRON-DELAUW and T.J. CURIEL. 2002. *Toxoplasma gondii*-infected human myeloid dendritic cells induce T. lymphocyte dysfunction and contact-dependent apoptosis. *Infect. Immunol.* 70: 1750–1760.