

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian untuk membuktikan aktivitas imunomodulator  $\beta$ -glucan *Candida albicans* yang mengandung  $\beta$ -glucan melalui uji kualitatif dengan menggunakan FTIR (lihat Gambar 5.5). Hasil menunjukkan bahwa pemberian  $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300  $\mu$ g/hari memberikan hambatan bermakna terhadap kolonisasi *Salmonella* Typhimurium tanpa peningkatan signifikan sIgA usus halus. Mencit terbukti mengalami infeksi *Salmonella* Typhimurium karena terdapat koloni bakteri tersebut pada usus, hepar, dan limpa mencit saat dilakukan pembedahan (Rahmadiani, 2016).

$\beta$ -glucan yang digunakan dalam penelitian ini bersumber dari *Candida albicans*. Spesies ini dipilih karena memiliki struktur ikatan (1 $\rightarrow$ 6) sebagai rantai cabang  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan dalam porsi yang besar yaitu sekitar 20% dibandingkan dengan fungi *Saccharomyces cerevisiae* yang hanya memiliki rantai cabang  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan sebesar 5% (Klis *et al.*, 2001). Senyawa  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)-glucan telah diketahui memiliki aktivitas imunomodulator poten. Potensi imunostimulan oleh  $\beta$ -glucan meningkat oleh semakin banyaknya struktur ikatan  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan sebagai rantai cabangnya (Cleary *et al.*, 1999). Karena *Candida albicans* kaya akan struktur rantai cabang  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan pada rantai utama  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucannya, maka organisme ini dipilih sebagai sumber  $\beta$ -glucan dalam penelitian potensi imunomodulator terhadap demam tifoid pada mencit ini.

Metode ELISA yang digunakan dalam penelitian ini adalah ELISA indirek. Antigen yang digunakan diperoleh dengan sonikasi *Salmonella* Typhimurium.

Antigen tersebut dilapiskan pada permukaan sumuran ELISA, selanjutnya direaksikan dengan sIgA sebagai antibodi primer yang telah diperoleh dari mukus usus halus mencit. Kemudian, kompleks antigen-antibodi primer direaksikan dengan antibodi sekunder *antimouse* IgA berlabel biotin-HRP, lalu kompleks antigen-antibodi primer-antibodi sekunder direaksikan dengan substrat kromogen TMB yang pada waktu optimal dihentikan reaksinya dengan menggunakan asam sulfur. Keseluruhan prosedur menghasilkan intensitas warna yang diukur dengan ELISA *reader* pada  $\lambda = 450$  nm. Metode ELISA indirek dipilih karena analit yang akan diukur adalah antibodi yang berfungsi sebagai antibodi primer sehingga akan memiliki spesifitas yang tinggi dengan sensitivitas yang baik.

### 6.1 Efek $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300 $\mu$ g/hari terhadap Kadar sIgA Mencit yang Diinduksi *Salmonella Typhimurium*

Antibodi sIgA pada usus halus dihasilkan oleh sistem imun adaptif setelah melalui beberapa tahap. Tahapan pembentukan sIgA tersebut terjadi setelah melalui proses imunitas *innate*. Pada tahap awal, *Salmonella Typhimurium* yang terdapat pada usus halus akan melakukan penetrasi dari lumen melewati sel M menuju *Peyer's patch*. Setelah berada di *Peyer's patch*, bakteri akan difagositosis oleh makrofag (Everest *et al.*, 2001). Pada saat bakteri difagositosis makrofag, makrofag akan menjadi aktif sehingga mensekresi IL-12. Sitokin tersebut akan membuat sel T menjadi aktif (Abbas *et al.*, 2012). Sel T yang aktif tersebut akan mensekresi APRIL dan menyebabkan sel B mengalami maturasi menjadi sel plasma yang mensekresi sIgA (Macpherson *et al.*, 2008).

Jalur maturasi sel B menjadi sel plasma juga dapat terjadi melalui mekanisme tidak bergantung sel T. Makrofag yang memfagositosis bakteri

menjadi aktif sehingga akan mempresentasikan antigen dari bakteri terfagositosis yang sudah diproses kepada sel B sehingga sel B tersebut akan mengalami maturasi menjadi sel plasma yang mensekresi sIgA (Pabst, 2012). Selain itu, makrofag yang aktif akan mensekresi BAFF dan APRIL yang merupakan sitokin untuk maturasi sel B menjadi sel plasma yang mensekresi Ig (Macpherson *et al.*, 2008). Penanda aktifnya makrofag adalah IL-12 (Abbas *et al.*, 2012).

Makrofag dapat diaktivasi oleh beberapa hal, salah satunya bakteri gram negatif. Makrofag yang aktif oleh bakteri gram negatif disebabkan karena pada saat makrofag memfagositosis bakteri tersebut, terjadi interaksi antara PAMP (*pathogen associated moleccular pattern*) bakteri gram negatif (lipopolisakarida) dengan PRR-TLR (*pathogen recognition receptor-toll like receptor*) pada makrofag. Makrofag yang aktif akan memproses partikel antigenik bakteri untuk dipresentasikan, memproduksi IL-12 untuk diferensiasi sel T naif menjadi sel  $T_H1$  (T helper 1), dan mengaktivasi sistem imun adaptif (Ma *et al.*, 2003).

Stimulasi TLR menyebabkan makrofag aktif sehingga sel tersebut mensekresi IL-12. Namun, koaktivasi TLR dengan reseptor dectin-1 justru menurunkan kadar IL-12 (supresi aktivitas makrofag) (Dennehy *et al.*, 2009). Dectin-1 merupakan reseptor tipe lectin C pada makrofag yang mengenali  $\beta$ -glucan. Selama ini, dectin-1 diketahui sebagai reseptor yang penting dalam aktivasi imunitas terhadap fungi. Hal ini disebabkan karena dectin-1 pada makrofag yang teraktivasi oleh  $\beta$ -glucan menyebabkan makrofag tersebut aktif (Sun dan Zhao, 2007). Aktivasi makrofag merupakan kunci untuk mulai berlangsungnya imunitas adaptif seperti produksi sIgA oleh sel plasma (Pabst, 2012).

Pada penelitian ini, kadar sIgA kelompok  $\beta$ -glucan *Candida albicans* lebih rendah dari kelompok lainnya (lihat Gambar 5.9). Hal ini kemungkinan disebabkan karena terjadi koaktivasi TLR dan dectin-1 pada makrofag kelompok ini. Kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan siprofloksasin 15 mg/kg BB/hari 2dd1 memiliki kadar sIgA lebih tinggi karena tidak diberi  $\beta$ -glucan *Candida albicans* sehingga tidak terjadi koaktivasi TLR dan dectin-1.

Bakteri juga memiliki partikel  $\beta$ -glucan pada membran selnya. Namun, berbeda dengan fungi, struktur  $\beta$ -glucan pada dinding sel bakteri adalah  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-glucan sedangkan pada dinding sel fungi adalah  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)-glucan (Chan, 2009). Kedua struktur tersebut menghasilkan aktivitas yang berbeda secara farmakologis. Struktur  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-glucan tidak berfungsi sebagai imunomodulator, sedangkan  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)-glucan menghasilkan efek imunomodulator (Stier *et al.*, 2014). Hal ini kemungkinan disebabkan karena afinitas yang berbeda antara  $\beta$ -glucan pada bakteri dan fungi. Dectin-1 memiliki ligan berupa  $\beta$ -glucan pada fungi seperti *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, dll. (Dennehy dan Brown, 2007). Oleh karena itu, walaupun *Salmonella Typhimurium* memiliki  $\beta$ -glucan pada membran selnya tetapi dapat diasumsikan tidak terjadi aktivasi dectin-1.

Kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan siprofloksasin 15 mg/kg BB/hari 2dd1 diasumsikan sama-sama mengalami aktivasi TLR oleh flora normal yang terdapat pada usus halus mencit (Sommer dan Backhed, 2013). Namun, tiap kelompok memiliki kadar sIgA yang berbeda. Kelompok kontrol negatif memiliki kadar sIgA terendah dibandingkan dua kelompok lainnya. Hal ini mungkin disebabkan karena aktivasi TLR pada kelompok ini tidak sekuat kedua

kelompok lainnya yang mendapat tambahan bakteri oleh perlakuan induksi *Salmonella Typhimurium*.

Kelompok siprofloksasin 15 mg/kg BB/hari 2dd1 memiliki kadar slgA lebih tinggi daripada kelompok kontrol positif. Padahal, dapat diasumsikan bahwa aktivasi TLR pada kelompok ini tidak sekuat kelompok kontrol positif karena pada kelompok siprofloksasin 15 mg/kg BB/hari 2dd1 sebagian bakteri kemungkinan mati sehingga jumlah bakteri pada kelompok ini lebih sedikit. Lebih tingginya kadar slgA pada kelompok siprofloksasin 15 mg/kg BB/hari 2dd1 daripada kelompok kontrol positif mungkin disebabkan oleh sifat dari *Salmonella Typhimurium* yang menghambat sel dendritik (Monack, 2012).

Sel dendritik mempresentasikan antigen *Salmonella Typhimurium* dengan terlebih dahulu mengendositosis bakteri tersebut dalam fagosom. Kemudian, fagosom berisi bakteri tersebut akan mengalami fusi dengan lisosom untuk dicerna dengan protease. Fusi fagosom dan lisosom menjadi fagolisosom dimediasi oleh protein Rab7 pada fagosom. Setelah mikroba dicerna dalam fagolisosom, bagian antigeniknya akan dipresentasikan oleh MHC sehingga oleh presentasi antigen ini, sistem imun adaptif yang spesifik akan aktif (Abbas *et al.*, 2012; D'Costa *et al.*, 2015).

Sel dendritik adalah APC yang penting dalam pembentukan slgA baik dalam jalur dependen sel T ataupun independen sel T. Akibatnya, kadar slgA kelompok kontrol positif lebih rendah daripada kelompok siprofloksasin 15 mg/kg BB/hari 2dd1 karena fungsi kunci pembentukan slgA yang diperankan sel dendritik sebagai APC kemungkinan ditekan oleh *Salmonella Typhimurium* pada kelompok ini karena bakteri tersebut mensekresi SopD2 yang menghambat protein Rab7 pada fagosom sehingga fusi fagosom dan lisosom tidak terjadi.

Akibatnya, tidak terjadi pemrosesan bagian antigenik bakteri untuk dipresentasikan oleh sel dendritik (D'Costa *et al.*, 2015).

## 6.2 Efek $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300 $\mu$ g/hari terhadap Jumlah Koloni *Salmonella* Typhimurium Usus Halus Mencit Model Demam Tifoid

Kadar sIgA usus halus mencit memang tidak meningkat pada pemberian  $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300  $\mu$ g. Namun, potensi  $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300  $\mu$ g sebagai kandidat terapi demam tifoid tidak bisa hanya diukur berdasarkan parameter tersebut. Parameter yang jauh lebih penting untuk membuktikan potensi  $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300  $\mu$ g sebagai kandidat terapi demam tifoid adalah hambatan kolonisasi *Salmonella* Typhimurium pada usus halus karena parameter ini membuktikan secara langsung hubungan pemberian  $\beta$ -glucan terhadap jumlah bakteri penyebab demam tifoid. Hasil perhitungan kolonisasi bakteri pada usus (lihat Gambar 5.10) menunjukkan bahwa  $\beta$ -glucan *Candida albicans* 300  $\mu$ g memiliki potensi sebagai kandidat terapi demam tifoid walaupun tidak sebaik siprofloksasin 15 mg/kg BB/hari 2dd1 .

Telah dibahas sebelumnya bahwa efek  $\beta$ -glucan secara umum menurunkan kerja makrofag (jika terjadi koaktivasi dengan TLR) yang akibatnya menurunkan sistem imunitas adaptif. Namun, kekebalan terhadap *Salmonella* Typhimurium bukan hanya diperankan oleh makrofag dan sIgA. Neutrofil merupakan sel fagosit yang penting dalam mengatasi infeksi *Salmonella* Typhimurium. Neutrofil membunuh *Salmonella* Typhimurium dengan cara memproduksi hipoklorit di fagosom dimana mekanisme ini masih efektif dalam membunuh bakteri tersebut tidak seperti mekanisme antibakteri makrofag yang telah dimanipulasi oleh *Salmonella* Typhimurium (Fenlon dan Slauch, 2014). Dengan aksi dari neutrofil, *Salmonella* Typhimurium yang berada di lingkungan

ekstraseluler baik di lumen usus halus maupun di dalam jaringan usus (berasal dari *Salmonella* Typhimurium yang keluar dari makrofag lisis) dibersihkan oleh neutrofil (Broz *et al.*, 2012).

Saat terjadi infeksi, respon imun yang kuat perlu dimiliki oleh hospes untuk segera mengatai infeksi tersebut. Salah satu hal yang terpenting adalah stimulasi adekuat sel polimorfonuklear di antaranya adalah neutrofil. Neutrofil perlu segera mencapai lokasi infeksi untuk membersihkan mikroba penyebab infeksi. Oleh sebab itu, kemotaksis neutrofil perlu ditingkatkan dengan cepat untuk menghasilkan respon anti infeksi yang kuat. Peningkatan kemotaksis neutrofil merupakan efek dari  $\beta$ -glucan (LeBlanc *et al.*, 2006). Pada awalnya,  $\beta$ -glucan merupakan partikel polimer glukosa besar. Polimer ini akan difagositosis oleh makrofag untuk difragmentasi menjadi fragmen yang lebih kecil. Fragmen  $\beta$ -glucan tersebut kemudian berikatan dengan CR3 (*complement receptor 3*) pada neutrofil, sehingga meningkatkan kemotaksis fagosit tersebut (Chan *et al.*, 2009). Dengan mekanisme peningkatan kemotaksis neutrofil inilah kemungkinan terjadi penurunan koloni *Salmonella* Typhimurium pada usus halus mencit model demam tifoid.

Pada penelitian ini hambatan kolonisasi *Salmonella* Typhimurium oleh siprofloksasin lebih tinggi daripada oleh  $\beta$ -glucan *Candida albicans*. Hal ini mungkin terjadi karena perbedaan pola eliminasi siprofloksasin dan  $\beta$ -glucan *Candida albicans*. Siprofloksasin menghambat *Salmonella* Typhimurium secara langsung yaitu oleh hambatan DNA gyrase yang menyebabkan gangguan replikasi dan transkripsi DNA bakteri dan akibatnya bakteri akan mati. Sedangkan  $\beta$ -glucan melalui jalur stimulasi sistem imun yang pada penelitian ini belum diketahui secara spesifik bagian dari sistem imun yang terlibat. Stimulasi

sistem imun membutuhkan waktu yang panjang yang diawali dari pengenalan antigen, ekspansi klonal, mekanisme efektor, dan mekanisme regulator, sedangkan hambatan oleh siprofloksasin hanya melalui tahap penetrasi ke dalam nukleus bakteri. Karena itu, hambatan kolonisasi *Salmonella* Typhimurium oleh siprofloksasin lebih tinggi dari  $\beta$ -glucan.

### 6.3 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini, sumber  $\beta$ -glucan yang digunakan adalah *Candida albicans* yang dapat bersifat patogen pada individu yang *immunocompromised*. Penelitian ini telah memberi informasi awal tentang potensi  $\beta$ -glucan fungi dalam menghambat kolonisasi *Salmonella* Typhimurium sehingga menjembatani penelitian selanjutnya menggunakan fungi spesies lain yang lebih sesuai dikonsumsi oleh manusia sebagai anti demam tifoid. Pada penelitian ini, belum diketahui waktu pemberian  $\beta$ -glucan *Candida albicans* yang menghasilkan respon eradikasi demam tifoid sempurna (tidak ada lagi koloni *Salmonella* Typhimurium di dalam tubuh mencit). Namun, efek hambatan kolonisasi *Salmonella* Typhimurium pada usus halus mencit oleh  $\beta$ -glucan *Candida albicans* telah terbukti dalam penelitian ini meskipun efek hambatan kolonisasi oleh siprofloksasin lebih tinggi.