

Peningkatan Aktivitas Makrofag Desidua Mencit Bunting yang Diinfeksi *Toxoplasma gondii*

The Increase of Desidual Macrophages Activity in Infected *Toxoplasma gondii* Pregnant mice

Lucia Tri Suwanti

Departemen Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Kampus C Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115.
Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015 email : tswant@yahoo.com

Abstract

The objective of this study was to know the effect of *Toxoplasma gondii* infection to the increase of macrophages activity in pregnant mice decidua. Forty-eight pregnant Swiss mice were divided into 6 groups. Group I, first week gestation non-infected mice. Group II, first week gestation infected mice. Group III, second week gestation non-infected mice. Group IV, second week gestation infected mice. Group V, third week gestation non-infected mice and group VI, third week gestation infected mice. Mice were infected with 1×10^5 tachyzoites by intraperitoneal. Four days post infection, mice were sacrificed and placenta was removed to observe the macrophages activity. The increase of macrophages activity in pregnant mice deciduas was determined by the increase of TNF- α expression in decidual macrophages by using immunohistochemistry method. The data were analysed by ANOVA. In comparison with uninfected mice, macrophages activity significantly increased in infected mice decidua ($p < 0,01$). By LSD post hoc test, all groups were significantly difference. In infected mice, TNF- α expression in first, second, and the third week gestation were 35.59%, 30.47% and 30.18% and in uninfected mice were 23.99%, 14.12%, and 10.64%. This study concluded that *Toxoplasma gondii* infection effected to the increase of decidual macrophages activity.

Key words: Decidual macrophage, *Toxoplasma gondii*, TNF- α

Pendahuluan

Toxoplasma gondii adalah protozoa intraseluler obligat. Infeksi *T. gondii* mampu membangkitkan baik imunitas nonspesifik maupun spesifik (Wyler, 1990). Imunitas nonspesifik lebih banyak diperankan oleh makrofag dan sel natural killer (NK). Imunitas spesifik ditunjukkan dengan kemampuan *T. gondii* menginduksi respons humoral dan seluler yang mana respons seluler terhadap infeksi *T. gondii* lebih dominan dibanding dengan respons humoral (Denkers dan Gazzinelli, 1998).

Menurut Denkers dan Gazzinelli (1998), pada infeksi awal, makrofag yang terinfeksi takizoit *T. gondii* memproduksi interleukin (IL)-12, tumor necrotic factor (TNF)- α , IL-1 β dan IL-15. Sitokin IL-12 mengaktifkan sel NK untuk memproduksi interferon (IFN)- γ . Pada infeksi lanjut, yang mana sudah terjadi imunitas adaptif, takizoit yang menginfeksi makrofag atau sel lain yang berperan sebagai antigen presenting cell (APC), dicerna oleh lisosom dan antigen takizoit *T. gondii* dipresentasikan oleh major histocompatibility

complex (MHC) II yang merupakan molekul membran dari makrofag ataupun APC. Antigen yang dipresentasikan dikenali dan ditangkap oleh reseptor (TCR) yang dimiliki limfosit T helper (sel Th). Ikatan antara antigen dan reseptor sel Th memicu sel Th memproduksi IL-2. Takizoit *T. gondii* juga memicu APC menghasilkan IL-12. Interleukin-12 yang dihasilkan oleh makrofag dan APC bekerja sinergis dengan IL-2 mendorong diferensiasi sel Th menjadi Th1. Sel Th1 menghasilkan IFN- γ . *T. gondii* merupakan parasit intraseluler, sehingga apabila menginfeksi makrofag ataupun APC, antigen juga dipresentasikan oleh molekul MHC I yang juga dimiliki oleh makrofag dan APC. Antigen yang dipresentasikan oleh MHC I dikenali dan ditangkap oleh reseptor yang dimiliki oleh sel T sitolitik (sel T CD8 $^+$). Ikatan antigen dan reseptor mengaktifkan sel T CD8 $^+$ dan memicu sel T CD8 $^+$ memproduksi IFN- γ . Keberadaan IL-2 yang dihasilkan oleh sel Th1 juga memperkuat aktivasi sel T CD8 $^+$ sehingga produksi IFN- γ semakin banyak. IFN- γ baik yang dihasilkan oleh sel NK, Th1 dan T CD8 $^+$

memicu terjadinya aktivasi dari makrofag dan mendorong fungsi makrofag sebagai mikrobisida.

Makrofag yang teraktivasi oleh IFN- γ akan menghasilkan TNF- α dan NO (Baines, 2002). Makrofag merupakan leukosit yang dominan di desidua (vice and Johnson, 2000). Semua tipe sel dari berbagai organ tubuh kecuali eritrosit dapat terinfeksi oleh *T. gondii* (Dubey et al., 1998), maka diasumsikan bahwa sel di uteroplasenta juga terinfeksi sehingga makrofag di desidua aktivitasnya mengalami peningkatan.

Penelitian ini bertujuan membuktikan terjadi peningkatan aktivitas makrofag desidua mencit yang diinfeksi *T. gondii* dibandingkan dengan mencit yang tidak diinfeksi baik pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga berdasarkan pada peningkatan presentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α .

Metode Penelitian

Hewan coba

Hewan coba adalah mencit betina umur 2 bulan galur Swiss. Hewan coba diperoleh dari laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.

Isolat *T. gondii*

Isolat *T. gondii* yang digunakan galur RH yang diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Isolat diperbanyak dengan cara menginokulasi 1 x 10³ takzoit ke cavum peritoneum mencit sehat.

Perlakuan

Untuk mendapatkan umur kebuntingan yang sama, 48 ekor mencit betina umur 2 bulan digertak berahi dengan kombinasi 5 IU *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) dan 5 IU *human chorionic gonadotrophin* (HCG). Mencit bunting dibagi secara acak menjadi 6 kelompok. K1: mencit bunting 4,5 hari (minggu pertama) tidak diinfeksi. K2: mencit bunting 9,5 hari (minggu kedua) tidak diinfeksi. K3: mencit bunting 14,5 hari (minggu ketiga) tidak diinfeksi. P1: mencit bunting 4,5 hari (minggu pertama) diinfeksi. P2: mencit bunting 9,5 hari (minggu kedua) diinfeksi dan P3: mencit bunting 14,5 hari (minggu ketiga) diinfeksi.

Empat hari setelah infeksi, mencit dikorbankan dan plasenta mencit diambil untuk dilakukan pewarnaan imunohistokimia. Plasenta difiksasi dalam bufer formalin 10 % untuk dilakukan *embedding paraffin*.

Pengecatan imunohistokimia

Pengecatan menggunakan streptavidin dan biotin (Instruction Dako LSAB + Kit, Peroxidase). Plasenta dalam *embedding paraffin*, dipotong setebal 5 μ m. Jaringan dideparafinisasi dalam xylol 2 kali masing-masing 5 menit, selanjutnya secara berturut-turut dimasukkan dalam ethanol absolut 2 kali 3 menit, ethanol 95% 2 kali masing-masing 3 menit dan ethanol 70% 3 menit. Terakhir dicuci dengan aquabides. Jaringan ditetesi dengan proteinase K selama 5 menit. Cuci dengan PBS 2 kali, selanjutnya ditetesi *hydrogen peroxidase* (H₂O₂) 3 % selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali. Setiap sayatan jaringan diinkubasi dalam antibodi poliklonal kelinci terhadap TNF- α mencit selama 30 menit. Selanjutnya jaringan diinkubasi dalam antibodi sekunder yang dilabel dengan biotin (Link) selama 30 menit, dicuci dengan PBS 2 kali. Kemudian preparat ditetesi streptavidin peroxidase selama 15-30 menit, cuci dengan PBS 2 kali dan terakhir dimasukkan dalam larutan substrat DAB selama 5-10 menit. Untuk *counterstain*, digunakan meyer hematoxylin, diinkubasi 30 detik pada suhu kamar kemudian dicuci 3 kali dengan dH₂O. Preparat selanjutnya dikeringkan dan ditutup dengan *cover glass*.

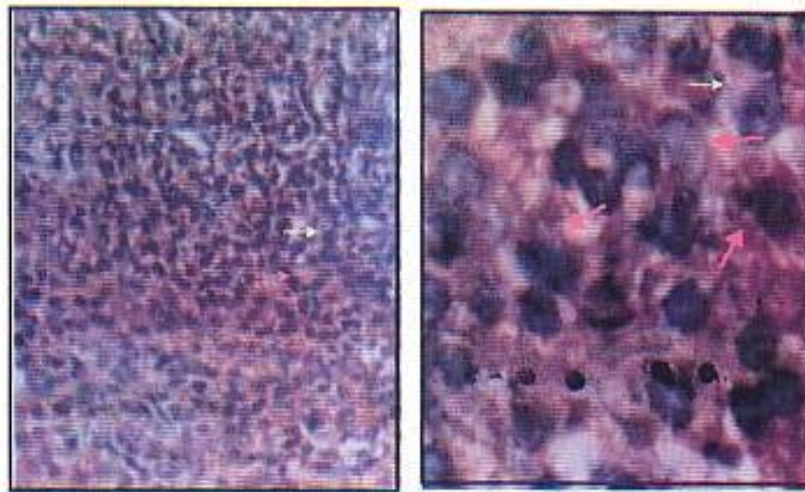
Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. *Randomized posttest only control group design* merupakan rancangan penelitian yang dipilih, karena pengukuran awal tidak mungkin dilakukan.

Data peningkatan aktivitas makrofag desidua berdasarkan pengamatan peningkatan persentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α dan dianalisis dengan Anava serta dilanjutkan dengan uji beda LSD.

Hasil dan Pembahasan

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antara presentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α pada kelompok mencit diinfeksi dan tidak diinfeksi ($p < 0,01$) (Tabel 1). Presentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α kelompok mencit terinfeksi lebih tinggi dari pada kelompok mencit tidak terinfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas makrofag desidua pada kelompok mencit terinfeksi. Gambar 1 menunjukkan makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α .



Gambar 1. Makrofag Desidua yang Menghasilkan TNF- α . Pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi poliklonal kelinci anti-TNF- α . A. Pembesaran 100x, B. Pembesaran 400 x. Tanda panah merah ($\rightarrow$): sel yang positif. Tanda panah kuning ($\rightarrow$) sel yang negatif.

Tabel 1. Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Makrofag Desidua yang Mengekspresikan TNF- α pada Mencit yang Diinfeksi dan Tidak Diinfeksi (dalam persen).

Variabel	Kelompok	
	Tidak Infeksi	Infeksi
Persentase Makrofag Desidua Penghasil TNF- α	16,25 ^a $\pm$ 9,03	32,08 ^b $\pm$ 7,30

Tabel 2. Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Makrofag Desidua yang Mengekspresikan TNF- α pada umur Kebuntingan Minggu I, II dan III (dalam persen).

Perlakuan	Umur Kebuntingan		
	Minggu I	Minggu II	Minggu III
Tidak Infeksi	23,99 ^a $\pm$ 5,48	14,12 ^b $\pm$ 9,30	10,64 ^b $\pm$ 6,47
Infeksi	35,59 ^c $\pm$ 6,13	30,47 ^d $\pm$ 5,38	30,18 ^d $\pm$ 9,34

Superskrip berbeda pada nilai rerata tiap variabel menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$)

Hasil Uji LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada tiap kelompok pengamatan (Tabel 2). Berdasarkan umur kebuntingan mencit, baik pada mencit yang tidak diinfeksi maupun yang diinfeksi, presentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α tertinggi pada kebuntingan minggu pertama dan mulai menurun pada umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga. presentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α pada umur kebuntingan minggu pertama berbeda nyata dengan pada kelompok mencit umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga tetapi pada

umur kebuntingan minggu kedua tidak berbeda nyata dengan minggu ketiga. Peningkatan berdasarkan ratio antara jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α pada mencit yang diinfeksi dan tidak diinfeksi baik pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga secara berturut-turut adalah 1,5 kali (dari 23,99% menjadi 35,59%), 2,3 kali (dari 14,12% menjadi 30,47%), dan 2,8 kali (dari 10,64% menjadi 30,18%).

Ada beberapa penjelasan mengapa presentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α pada mencit yang diinfeksi mengalami

peningkatan dibanding dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi. Makrofag merupakan populasi leukosit yang dominan di desidua (Vice dan Johnson, 2000). Menurut Dubey *et al.* (1998), *T. gondii* menginfeksi semua tipe sel dan menyebar luas ke berbagai organ. Dari pernyataan tersebut berarti bahwa *T. gondii* juga menginfeksi sel termasuk makrofag yang terdapat di desidua plasenta. Makrofag yang terinfeksi *T. gondii* teraktivasi dan mengekspresikan berbagai sitokin termasuk TNF- α (Denkers dan Gazzinelli, 1998). Menurut Suwanti (2005), infeksi *T. gondii* pada mencit bunting meningkatkan ekspresi IFN- γ di Desidua. Peningkatan IFN- γ di desidua ini juga yang diduga sebagai pemicu terjadinya peningkatan aktivitas makrofag yang ditandai dengan peningkatan ekspresi TNF- α . Hal ini didasarkan pada pendapat Baines (2002) yang mengatakan bahwa IFN- γ memicu makrofag menghasilkan TNF- α dan NO. Jadi peningkatan TNF- α dari penelitian ini diakibatkan karena pengaruh langsung dari makrofag yang terinfeksi *T. gondii* ataupun pengaruh peningkatan kadar IFN- γ di desidua akibat infeksi *T. gondii*.

Peningkatan aktivitas Makrofag diperlukan untuk membunuh *T. gondii*. Menurut Denkers dan Gazzinelli (1998), TNF- α bekerja sinergis dengan IFN- γ menginduksi sintesis iNOS, yang akan menghasilkan NO untuk membunuh *T. gondii* dalam sel induk semang. NO tidak hanya bersifat toksoplasmasidal langsung, tetapi juga dapat mempercepat perubahan stadium *T. gondii* dari takizoit menjadi bradizoit (Bohne *et al.*, 1994). TNF- α juga merupakan sitokin penting yang diperlukan untuk pertahanan induk semang terhadap infeksi *T. gondii*, utamanya pada fase infeksi kronis (Deckert-Schluter *et al.*, 1998; Yap *et al.*, 1998).

Peningkatan ekspresi TNF- α pada penelitian ini juga sama dengan hasil penelitian yang ditunjukkan pada infeksi malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* adalah protozoa intraseluler obligat yang diklasifikasikan satu ordo dengan *T. gondii*. Menurut Fried *et al.* (1998), infeksi *P. falciparum* dapat meningkatkan kadar TNF- α , IFN- γ , dan IL-12 plasenta dan peningkatan ini berhubungan dengan kegagalan kebuntingan berupa kehilangan fetus dan berat lahir ringan.

Apakah peningkatan ekspresi TNF- α di desidua akibat infeksi *T. gondii* berhubungan dengan kegagalan kebuntingan perlu dikaji lebih lanjut. Hal ini mengingat banyak laporan yang mengatakan bahwa peningkatan kadar TNF- α di plasenta berhubungan dengan kematian embrio. Menurut Kanellopoulos-Lengevin *et al.* (2003), kematian embrio yang disebabkan oleh infeksi saluran reproduksi dan stre dihubungkan dengan peningkatan ekspresi TNF- α di lingkungan mikro plasenta.

Persentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α pada mencit yang tidak diinfeksi pada kelompok kebuntingan minggu pertama lebih tinggi dari pada kelompok minggu kedua dan ketiga. Hasil ini sama dengan pernyataan Gorivodsky *et al.* (1998) bahwa ekspresi TNF- α di plasenta sedikit sekali selama kebuntingan, puncak produksi terjadi pada pertengahan kebuntingan, kemudian menurun dan tetap stabil sampai akhir kebuntingan. Pada kebuntingan awal TNF- α diperlukan untuk plasentasi, diferensiasi blastosit dan trofoblas, serta invasi trofoblas. Urutan tersebut dipergunakan untuk menjelaskan mengapa peningkatan berdasarkan rasio antara persentase jumlah makrofag yang mengekspresikan TNF- α pada mencit diinfeksi dan tidak diinfeksi, tertinggi pada umur kebuntingan minggu ketiga (2,8 kali) diikuti minggu kedua (2,2 kali) dan minggu pertama (1,4 kali). Hal ini karena jumlah pembagi (persentase jumlah makrofag yang mengekspresikan TNF- α pada mencit tidak diinfeksi) lebih tinggi pada minggu pertama dibanding minggu kedua dan ketiga.

Persentase jumlah makrofag yang mengekspresikan TNF- α pada mencit diinfeksi pada kelompok kebuntingan minggu pertama lebih tinggi dari pada minggu kedua dan ketiga. Hal ini karena pada saat kebuntingan hormon estrogen meningkat sejalan dengan umur kebuntingan, sedangkan hormon estrogen menghambat aktivitas makrofag (Roberts, *et al.*, 2001). Dengan demikian, meskipun sama-sama teraktivasi oleh *T. gondii* baik secara langsung maupun tidak langsung, aktivitas makrofag pada kebuntingan minggu kedua dan ketiga lebih rendah. Tetapi perlu dilakukan penelitian lanjut untuk membuktikan penurunan aktivitas makrofag akibat infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga berhubungan dengan hormon estrogen.

Kesimpulan

Infeksi *T. gondii* pada mencit baik pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga mengakibatkan peningkatan aktivitas makrofag desidua yang ditandai dengan peningkatan persentase jumlah makrofag yang mengekspresikan TNF- α

Daftar Pustaka

- Baines MG. 2002. Immunology of Pregnancy. Document Online: <http://www.microimm.mcgill.ca/pdf>. Diakses tanggal 14-09-2003 jam 23.10
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. Infect. Immun. 62:1761-1767

- Deckert-Schlüter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, and Schlüter D. 1998. Crucial Role of TNF Receptor Type 1 (p55), But Not of TNF Receptor Type 2 (p75), in Murine Toxoplasmosis. *J. Immunol.*, 160: 3427-3436
- Denkers EY, Gazzinelli RT. 1998. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:569-588
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *CMR*, 11 (2): 267-299
- Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. 1998. Malaria Elicits Type 1 Cytokines in the Human Placenta: IFN- γ and TNF- α Associated with Pregnancy Outcomes. *J. Immunol.*, 1998, 160: 2523-2530
- Gorivodsky M, Zemlyak I, Orenstein H, Savion S, Fein A, Torchinsky A, and Toder V. 1998. TNF- α Messenger RNA and Protein Expression in the Uteroplacental Unit of Mice with Pregnancy Loss. *J. Immunol.*, 160: 4280-4288
- Kanellopoulos-Lengevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, and Ojcius DM. 2003. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 121
- Roberts CW, Walker W, Alexander J. 2001. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clin. Micro. Rev.*, 14: 476-488
- Suwanti LT. 2005. Mekanisme Peningkatan Apoptosis Trofoblas Mencit Bunting Terinfeksi *Toxoplasma gondii* Melalui Peningkatan Sel Desidua Penghasil IFN- γ dan TNF- α serta Trofoblas Penghasil Fas dan TNFR-1. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Vince GS, Johnson PM. 2000. Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues. *Biochem. Soc. Trans* 28, 191-195
- Wyller DJ. 1990. Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspect, W.H. Freeman and Co., New York
- Yap GS, Scharton-Kersten T, Charest H, and Sher A. 1998. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J. Immunol.* 160: 1340-1345