

## Aktivitas Fagositosis Sel Monosit dengan Pemberian Rebusan Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora L.*) terhadap *Candida albicans*

(Activity of Monocytes Phagocytosis by Provision of Coffea Robusta Leaf Decoction (*Coffea canephora L.*) to *Candida albicans*)

Aliful Nisa Noviga, Melok Aris Wahyukundari, I. D. A. Ratna Dewanti  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Korespondensi: Aliful Nisa Noviga. E-mail:annoviga@gmail.com

### ABSTRACT

**Background:** *Candidiasis* is caused by *Candida albicans* (*C. albicans*) that living commensally in the oral cavity that can turn into pathogens. *C. Albicans* pathogen is influenced by host factors called immune system, one of which monocytes. Current antifungal drugs are not effective and resistant against *C. albicans*. On the other hand, coffeerobusta leaves contains of polyphenols (tannins and CGA) and caffeine were shown to have effects as antioxidant, antifungal, and immunomodulator. A new antifungal agent which can also act as an immunomodulator is required. **Purpose:** To determine the activity of monocytes phagocytosis by provision of robusta coffee leaves decoction to *C. albicans*. **Methods:** This study used isolated monocytes which had been divided into 2 control groups of controls; K0 (untreated) and K1 (given Isoprinosine) and 4 treatment groups: P1 (25% decoction), P2 (50% decoction), P3 (75% decoction), and P4 (100% decoction). After the treatments had given, *C. albicans* exposure was conducted and monocyte phagocytosis activity was observed subsequently. **Results:** There was an increase in phagocytosis activity in the group of P1, P2, P3, and P4 compared with K0 and K1. **Conclusion:** Robusta coffee leave decoction of the phagocytosis can increase the activity of monocytes phagocytosis to *C. albicans*.

**Keywords:** *C. albicans*, coffee robusta leaf decoction, monocyte, phagocytosis

### Pendahuluan

*Candida albicans* merupakan jamur komensal yang normal terdapat di kulit dan mukosa rongga mulut pada individu yang sehat namun juga bersifat patogen oportunistik.<sup>1,2</sup> Pada individu dengan sistem imun yang terganggu, *C. albicans* dapat menyebabkan infeksi *candidiasis*, mulai dari infeksi superfisial (*oral candidiasis* dan *vulvovaginalcandidiasis*) hingga infeksi sistemik yang mengancam jiwa.<sup>2,3</sup> Rata-rata kematian akibat *candidiasis* sistemik adalah 71%-79%.<sup>1</sup>

Patogenesis *candidiasis* merupakan gabungan dari dua faktor yaitu virulensi *C. albicans* dan hospes.<sup>2</sup> Monosit adalah sel fagosit dan merupakan bagian dari sistem imun tubuh (faktor hospes) yang memiliki peran penting dalam mengenali patogen jamur yang masuk dalam tubuh.<sup>4</sup>

Obat-obatan antifungi yang kini tersedia bekerja dengan merusak dinding sel jamur.<sup>5</sup> Obat-obatan tersebut memiliki beberapa kekurangan, misalnya pada obat *voriconazole* dari golongan *azole*, memiliki efek samping berupa edema perifer, mual, muntah, dan gangguan hati, dan gangguan

penglihatan (*scomata*).<sup>6</sup> Selain itu, kekurangan lain dari obat anti jamur adalah tidak efektif melawan jamur atau jamur muncul kembali, dan mengarah pada berkembangnya resistensi jamur yang memiliki dampak besar bagi kesehatan manusia. Peningkatan prevalensi infeksi akibat jamur juga menunjukkan dibutuhkannya agen antifungi baru yang lebih efektif.<sup>3</sup> Dibutuhkan agen antifungi baru yang tidak hanya menjadikan jamur sebagai targetnya, namun juga memiliki efek immunomodulator.

Disisi lain, tanaman kopi robusta merupakan komoditas unggulan nasional dengan areal perkebunan seluas 1, 23 juta ha atau setara dengan 92,5% dari keseluruhan tanaman kopi.<sup>7</sup> Hasil penelitian mengenai manfaat biji kopi telah banyak dilaporkan, namun penelitian mengenai manfaat daun kopi masih belum banyak dilakukan.<sup>8</sup>

Daun kopi robusta mengandung antioksidan dan kafein yang lebih tinggi dibandingkan dengan kopi arabika.<sup>9</sup> Antioksidan pada kopi robusta berupa senyawa polifenol dalam bentuk tannin dan *Chlorogenic acid* (CGA).<sup>8,10-11</sup> Antioksidan diperlukan untuk menstabilkan (*Reactive Oxidative Species*) ROS yang dihasilkan dari proses seluler seperti fagositosis sehingga dapat meningkatkan viabilitas sel.<sup>12-13</sup> Selain aktivitas antioksidan, polifenol juga dapat berperan sebagai immunomodulator dengan menstimulasi produksi sitokin pro-inflamasi serta peningkatan produksi agen mikrobisidal berupa *Nitric oxide* (NO).<sup>14-15</sup> Sedangkan, kandungan CGA telah diketahui memiliki efek antifungi dengan cara merusak dinding sel jamur.<sup>11</sup> Kandungan daun kopi robusta lainnya adalah kafein yang juga telah

terbukti dapat memberikan efek sebagai immunomodulator.<sup>13-14</sup>

Efek antifungi dan immunomodulator rebusan daun kopi robusta belum pernah dilaporkan. Berdasarkan uraian tersebut, peneliti melakukan penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* menggunakan isolat monosit yang diberi rebusan daun kopi robusta kemudian dipapar *C. albicans* yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas fagositosis sel monosit yang diberi rebusan daun kopi robusta terhadap *C. albicans*.

### Metode Penelitian

Sampel dibagi ke dalam 2 kelompok kontrol yaitu kelompok kontrol negatif (tidak diberi perlakuan) dan kontrol positif (diberi 200µL *isoprinosine* 100mg/ml) serta 4 kelompok perlakuan, yaitu perlakuan 1 (diberi 200µL rebusan daun kopi robusta konsentrasi 25%), perlakuan 2 (diberi 200µL rebusan daun kopi robusta konsentrasi 50%), perlakuan 3 (diberi 200µL rebusan daun kopi robusta konsentrasi 75%), dan perlakuan 4 (diberi 200µL rebusan daun kopi robusta konsentrasi 100%). masing-masing kelompok terdiri dari 4 sampel.

Sampel penelitian menggunakan isolat monosit yang berasal dari darah vena periferil laki-laki dewasa yang tidak memiliki kelainan sistemik, tidak merokok, tidak mengkonsumsi obat-obatan terlarang, serta tidak meminum minuman keras. Sampel rebusan daun kopi robusta untuk perlakuan didapatkan dengan merebus 1000mg daun kopi robusta yang didapatkan dari Perkebunan Kopi Gunung Pasang, Kecamatan Panti, Kabupaten Jember dengan 1000ml aquades steril selama 30 menit. Kemudian dilakukan pengenceran sehingga didapatkan konsentrasi 100%, 75%, 50%, dan 25%.<sup>18</sup>

Tahap pertama yaitu persiapan meliputi sterilisasi alat, pembuatan rebusan daun kopi robusta, serta pembuatan biakan *C. albicans* ATCC 10231. *C. albicans* dibiakkan dalam media SDB-B dan diinkubasi selama 2x24 jam. Biakan *C. albicans* kemudian dibuat suspensi dengan standard 1 McFarland.<sup>19</sup>

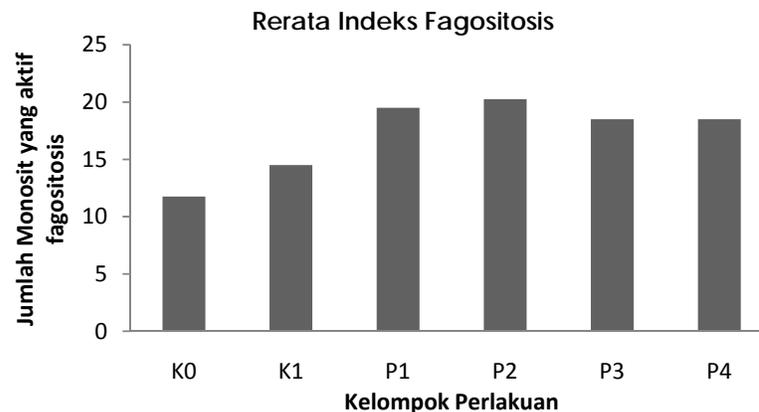
Tahap kedua yaitu pembuatan isolat monosit dari 12cc darah vena. Isolat monosit tersebut kemudian dikultur dengan menggunakan media M199 dan diberi perlakuan sesuai dengan kelompok sampel masing-masing. Kultur monosit diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 18-24 jam kemudian dilakukan pemaparan *C. albicans* sebanyak 100 µL. Selanjutnya, diinkubasi dan dilakukan pengamatan tiap jam selama 5 jam.

Tahap berikutnya adalah pengecatan dengan *giemza* dan dilakukan pengamatan pada tiap

kelompok dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Dilakukan pengamatan dan penghitungan per 100 sel monosit yang memfagositosis (menelan dan mengadhesi) *C. albicans* dengan pengulangan sebanyak 3x kemudian dihitung rata-ratanya.

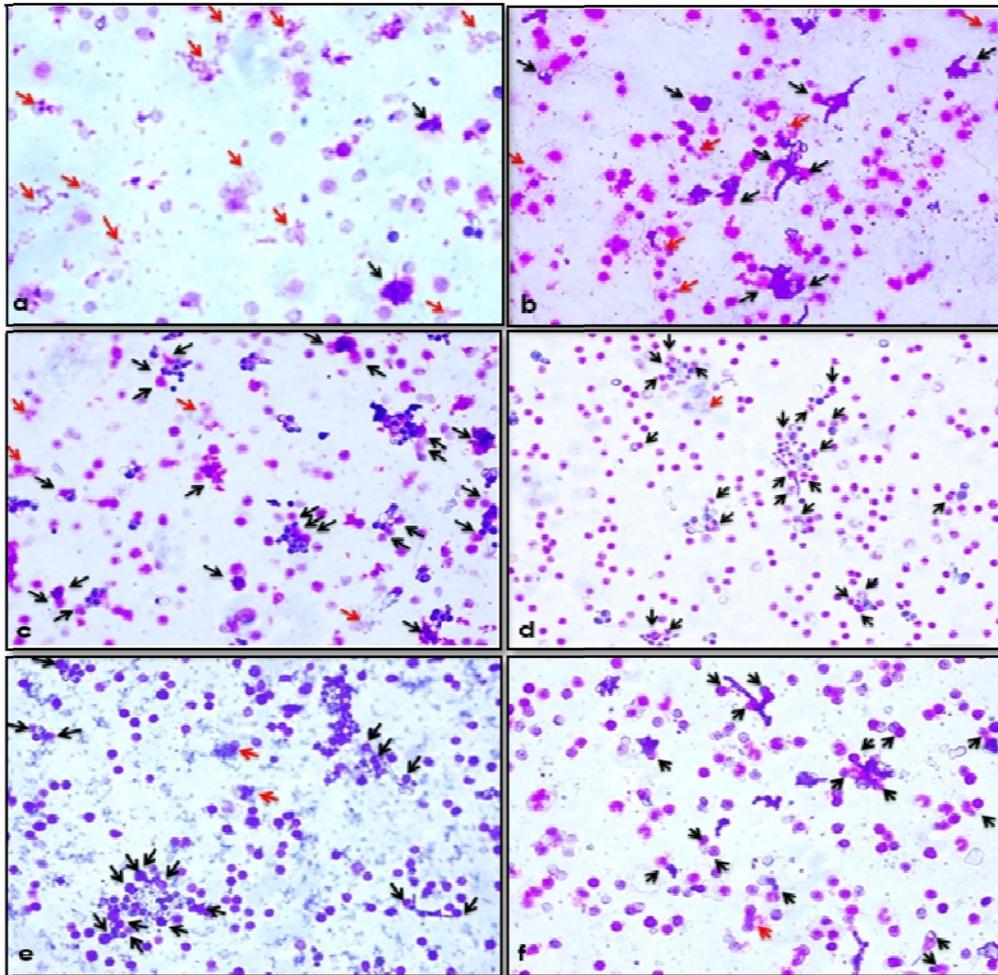
#### Hasil Penelitian

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan aktivitas fagositosis pada kelompok P1, P2, P3, dan P4 dibandingkan dengan kelompok kontrol K0 dan K1 dan peningkatan paling tinggi ditunjukkan oleh kelompok P2 (gambar 1 dan 2.). Hasil uji *One Way Anova*, didapatkan nilai  $p < 0,05$  sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan. Kemudian uji LSD didapatkan kesimpulan terdapat perbedaan signifikan antara semua kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol namun tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan.



**Gambar 1. Rerata Indeks Fagositosis Monosit terhadap *C. albicans* per 100 sel.**

Keterangan: K0 (Monosit tanpa diberi perlakuan); K1 (Monosit dengan isoprinosine); P1 (Monosit dengan rebusan daun kopi robusta konsentrasi 25%); P2 (Monosit dengan rebusan daun kopi robusta konsentrasi 50%); P3 (Monosit dengan rebusan daun kopi robusta konsentrasi 75%); P4 (Monosit dengan rebusan daun kopi robusta konsentrasi 100%)



**Gambar 2. Gambaran mikroskopik isolat monosit yang telah dipapar *C. albicans*.** Panah hitam menunjukkan aktivitas fagositosis sel monosit terhadap *C. albicans*, sedangkan panah merah menunjukkan gambaran sel monosit yang lisis dengan pewarnaan *giemza* dan perbesaran 400x. a) Monosit tanpa diberi perlakuan (K0), rerata indeks fagositosis mencapai 0,1175; b) Monosit dengan isoprinosine (K1), rerata indeks fagositosis mencapai 0,1450; c) Monosit dengan rebusan konsentrasi 25% (P1), rerata indeks fagositosis mencapai 0,1950; d) Monosit dengan rebusan konsentrasi 50% (P2), rerata indeks fagositosis mencapai 0,2025; e) Monosit dengan rebusan konsentrasi 75% (P3), rerata indeks fagositosis mencapai 0,1850; dan f) Monosit dengan rebusan konsentrasi 100% (P4), rerata indeks fagositosis mencapai 0,1850.

### Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan aktivitas fagositosis monosit terhadap *C. albicans* antara kelompok perlakuan (P1, P2, P3, dan P4) dengan pemberian rebusan daun kopi robusta dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan (K0) maupun kelompok dengan isoprinosine

sebagai bahan immunomodulator yang mampu meningkatkan aktivitas fagositosis monosit (K1). Proses fagositosis *C. albicans* oleh sel monosit diawali dari proses pengenalan mikroba patogen. PAMPs dari *C. albicans* akan menstimulasi sistem imun bawaan oleh monosit apabila berikatan dengan reseptor yang disebut PRRs.<sup>20-21</sup> Ikatan tersebut kemudian

akan memberi sinyal yang menginduksi respon pertahanan tubuh sel hospes, produksi sitokin pro-inflamasi (contohnya TNF- $\alpha$ ) dan fagositosis.<sup>4, 22-23</sup> Setelah *C. albicans* berikatan dengan reseptor sel fagosit, maka membran plasma dari sel fagosit tersebut akan membentuk lingkaran yang melingkupi mikroba hingga membentuk *intracellular vesicle*. Vesikel yang berisi partikel asing tersebut dinamakan fagosom. Fagosom kemudian berfusi dengan lisosom menjadi fagolisosom dan membunuh mikroba (mikrobisida) yang terjebak serta mengeluarkannya dari membran plasma. Salah satu mekanisme mikrobisida sel fagosit, yaitu melalui ROS. Proses pembentukan ROS atau disebut juga dengan *respiratory burst* oleh sel fagosit distimuli oleh IFN- $\gamma$  dan sinyal dari TLRs kemudian akan menghasilkan *hydroxyl radicals* ( $\cdot$ OH). Selain  $\cdot$ OH, contoh agen mikrobisida lainnya yaitu NO yang diinduksi oleh iNOS.<sup>4, 24</sup>

Peningkatan aktivitas fagositosis monosit yang diberi rebusan daun kopi robusta diduga disebabkan oleh kandungan kafein dan polifenol (dalam bentuk tannin dan CGA) dalam daun kopi robusta.<sup>25-26</sup> Mekanisme kafein dalam meningkatkan aktivitas fagositosis monosit terhadap *C. albicans* yaitu dengan berperan sebagai antagonis reseptor adenosin. Adenosin merupakan immunomodulator yang poten dan secara umum bekerja menekan kinerja sel-sel imun (anti-inflamasi). Adenosin yang berikatan dengan reseptor adenosin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, dan A<sub>3</sub> menekan produksi TNF- $\alpha$  oleh monosit. Adenosin juga menghambat timbulnya *respiratory burst* pada monosit melalui reseptor A<sub>3</sub>.<sup>16</sup> Penghambatan ikatan antara adenosin pada semua reseptor adenosin oleh kafein tersebut dapat memberikan efek pro-inflamasi oleh monosit.<sup>27</sup>

Mekanisme polifenol dalam meningkatkan aktivitas fagositosis monosit terhadap *C. albicans* menurut Kusdalinah, *et. al.*, (2014), polifenol memiliki komponen berupa *epigallocatechingallate* (EGCG) yang dapat membantu proses fagositosis. EGCG berperan dalam menstimulasi produksi *interleukin-1 alpha* (IL-1 $\alpha$ ), *interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$ .<sup>14</sup> Polifenol juga dapat meningkatkan produksi enzim iNOS sehingga dapat meningkatkan produksi agen mikrobisidal NO.<sup>15</sup> Stimulasi produksi sitokin pro-inflamasi serta peningkatan produksi iNOS diduga berperan dalam peningkatan fagositosis monosit terhadap *C. albicans*.

Hasil analisa data juga menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis pada antar kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan bermakna. Hal tersebut mengindikasikan bahwa peningkatan fagositosis yang terjadi pada kelompok perlakuan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi rebusan daun kopi robusta. Hal tersebut berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Horrigan, *et. al.* (2006) yang menyatakan bahwa kandungan kafein dalam kopi dapat berperan sebagai imunomodulator, baik berperan sebagai agen anti-inflamasi maupun pro-inflamasi bergantung pada dosis (konsentrasi kafein) yang bekerja.<sup>16</sup>

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pada semua konsentrasi kelompok perlakuan terdapat penurunan rata-rata jumlah monosit yang lisis dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Jaufari dan Azra (2005) bahwa kafein dalam konsentrasi rendah dapat meningkatkan kelangsungan hidup dan mencegah apoptosis monosit. Namun, mekanismenya belum dijelaskan secara pasti.<sup>17</sup>

Penurunan jumlah monosit yang lisis diduga disebabkan oleh adanya kandungan lain dalam daun kopi robusta, yaitu tannin dan CGA yang merupakan senyawa polifenol dan telah teruji secara *in vitro* memiliki aktivitas antioksidan.<sup>10-11</sup> Antioksidan diperlukan sel tubuh untuk melawan ROS. ROS merupakan radikal bebas yang bersifat sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan membran sel, inti sel, serta molekul kecil lainnya kemudian menyebabkan sel rusak. Munculnya ROS salah satunya disebabkan oleh proses fagositosis.<sup>12</sup> ROS diperlukan sebagai agen mikrobisida monosit untuk membunuh antigen.<sup>24</sup> Namun, bila jumlah ROS berlebihan dan jumlah antioksidan endogen tidak cukup untuk menstabilkannya maka akan terjadi stres oksidatif yang dapat mempengaruhi viabilitas sel (monosit).<sup>13</sup> Antioksidan dapat menstabilkan ROS sehingga tidak menyerang sel lain.<sup>12</sup> Penstabilan ROS oleh antioksidan yang terkandung dalam daun kopi robusta tersebut diduga dapat mencegah monosit menjadi lisis.

Kandungan CGA selain merupakan senyawa antioksidan juga telah teruji memiliki efek antifungi. CGA dapat merusak membran sel *C. albicans* dan mengakibatkan kebocoran ion dan bahan lain serta menghilangkan potensial membran.<sup>11</sup> Rusaknya membran sel *C. albicans* tersebut diduga dapat menghancurkan pertahanan *C. albicans* sehingga aktivitas fagositosis monosit terhadap *C. albicans* meningkat.

Peningkatan aktivitas fagositosis oleh monosit pada semua kelompok perlakuan dan penurunan jumlah sel yang lisis dibanding dengan kelompok kontrol negatif mengindikasikan bahwa kandungan zat aktif yang terkandung dalam rebusan daun kopi tersebut masih

dalam batas aman untuk dikonsumsi. Kafein memiliki dosis terapeutik 5 hingga 15µg/ml. Pada dosis tersebut, kafein memblokir reseptor adenosin.<sup>27</sup> Penelitian ini menggunakan konsentrasi rebusan 1000mg/ml dengan empat konsentrasi pengenceran yang berbeda, yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%. Namun, jumlah kandungan kafein dalam rebusan daun kopi belum diketahui secara pasti.

### Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu pemberian rebusan daun kopi robusta meningkatkan aktivitas fagositosis sel monosit terhadap *C. albicans*. Kelompok dengan konsentrasi rebusan 50% menunjukkan aktivitas paling tinggi dibandingkan semua kelompok namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik dibandingkan dengan sesama kelompok perlakuan.

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konsentrasi kafein dan polifenol (berupa tannin dan CGA) dalam rebusan daun kopi robusta untuk mengetahui dosis yang efektif sebagai zat immunomodulator dan antifungi. Untuk penelitian selanjutnya disarankan memilih konsentrasi rebusan 50% (P2) sebagai perlakuan.

### Daftar Pustaka

1. Akpan A dan Morgan R. Review oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78: 455-459.
2. Mayer FL, Duncan W, dan Bernhard H. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *J Virulence*. 2013; 4(2): 119-128.
3. Yun, Liang Yang. Virulence factors of candida species. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003; 36: 223-228.

4. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, dan Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by immune system. *J Microbiol.* 2008; 6: 67-78.
5. Hiller E, Zavrel M, Hauser N, Sohn K, Kentinscher AB, Lemuth K, Rupp S. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host: focus on The Function of cell wall proteins. *Int J of Med Microb.* 2011; 301: 384-389.
6. Limper Andrew H. An official american thoracic society statement: treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 83: 96-128.
7. Prasetya A dan Hermawan B. Idiotype kopi arabika tanaman belum menghasilkan pada lingkungan dataran rendah dan menengah. *Agrovigor.* 2001; 4(2): 62-69.
8. Bhuvaneswari S, SriPriya N, Balamurgan A, Siril A, Kasinathan V, Karthikeyan PT, dan Udaya PNK. Studies on the phytochemistry and bioefficacy of industrial crops – *Coffea canephora* and *Gravillea robusta* from Kolli Hills. *International J of Rsrch in Pharm Sci.* 2014; 5(2): 147-151.
9. Janzen S Oestreich. *Chemistry of coffe.* Hamburg: Elsevier. 2010.
10. Okuda T dan Ito H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *J Molecules.* 2011; 16: 2191-2217.
11. Sung WS dan Lee DG. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure Appl. Chem.* 2014; 82(1): 219-226.
12. Percival Mark. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insight* 1998; 31: 1-4.
13. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, dan Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal.* 2012; 5: 9-19.
14. Yusni HTR dan Achmad TH. Aktivitas polifenol teh hijau (*Camellia sinensis (L)O.Kuntze*) sebagai imunomodulator melalui respons supresi imunoglobulin E (IgE) pada rinitis alergika. *MKB.* 2015; 47(3): 160-166.
15. Kusdalinah, Johan A, dan Wijayahadi N. Pengaruh ekstrak buah naga daging merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap berat badan, indeks fagositosis makrofag dan produksi nitrit oksida makrofag (Studi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*). *Jurnal Gizi Indonesia* 2014; 2(2): 71-77.
16. Horrigan LA, Kelly JP, dan Connor TJ. Caffeine suppresses Tnf-alpha production via activation of the cyclic AMP/Protein Kinase A Pathway. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4: 1409-1417.
17. Jaufari M dan Azra R. Study of the effect of caffeine on induction of apoptosis in blood monocyte cells. *Daneshvar Medicine* 2005; 12(56): 13-18.
18. Oktavianto Ari. Daya Antijamur rebusan Daun Sirih Merah (*Piper croatum*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Secara In Vitro (Penelitian Eksperimental Laboratoris). Skripsi. Jember: Program Sarjana Universitas Jember. 2011.
19. Mahmoudabadi AZ, Zarrin M, dan Kiasat N. Biofilm formation and susceptibility to amphotericin B and fluconazole in *Candida albicans*.

- Jundishapur J Microbiol.* 2014; 7(7): 1-5.
20. Abbas AK, Lichtman AH, dan Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th rev ed. USA:Elsevier, 2012.
  21. Gow NAR dan Hube B. importance of the *Candida albicans* cell wall during comensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology* 2012; 15: 406-412.
  22. Kerrigan AM dan Brown GD. C-Type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009; 214: 562-575.
  23. Dambuzza IM dan Brown GD. C-type lectins in immunity: recent development. *Current Opinion in Immunology* 2015; 32: 21-27.
  24. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. *Roitts essential immunology*. 11th rev ed. Willey Blackwell Publishing, 2011.
  25. Castro RDDe dan Marracini P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Journal Plant Physiol.* 2006; 18(1): 175-199.
  26. Ribeiro Jdan Sebastiao AM. Caffeine and adenosine. *Journal of alzheimer's disease* 2010; 20: 3-15.
  27. Valdez RC, Karp MW, Ahlawat R, Cristofalo EA, Nathan A, dan Gauda E. Caffeine modulates TNF- $\alpha$  production by cord blood monocytes: the role of adenosine receptors. *Pediatric Research* 2009; 65(2): 203-208.