

ARTIKEL PENELITIAN

Penurunan Kadar IL-1 β Makrofag Terpapar Agregat Bakteri *Actinomycetemcomitans* setelah Pemberian Minyak Atsiri Temu Putih

Juni Handajani*, Siti Fatimah**, Ristini Asih**, dan Antinah Latif**

*Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

** Program Studi Ilmu Keperawatan Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*JI Denta No 1 Sekip Utara Yogyakarta, Indonesia; e-mail: junihandajani@yahoo.com

ABSTRAK

Kunci regulator terhadap respons inflamasi diketahui melalui aktivasi interleukin-1 β (IL-1 β). Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear berperan dalam sistem imun *innate* dan adaptif. Sitokin yang disekresikan makrofag sebagai respons terhadap patogen antara lain IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , dan *chemokine*. Minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) diduga memiliki efek anti inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar IL-1 β pada makrofag terekspose agregat bakteri *actinomycetemcomitans* setelah pemberian minyak atsiri temu putih. Subjek penelitian adalah 10 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 2 kelompok (perlakuan dan kontrol), masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Kelompok perlakuan diberi minum minyak atsiri temu putih dosis 30,6 μ l/ml dan kelompok kontrol diberi aquabides selama 14 hari. Gingiva anterior rahang bawah tikus diolesi *A.actinomycetemcomitans* sebanyak 100 μ l dalam CMC 2% pada hari ke-7 setelah pemberian minum bahan uji dan kontrol selama 7 hari. Pada hari ke-15, tikus pada masing-masing kelompok dianestesi lalu makrofag dikoleksi dari cairan peritoneal. Kadar IL-1 β makrofag diukur menggunakan *ELISA kit* (R&D Systems, USA), selanjutnya data dianalisis menggunakan uji-t. Hasil penelitian menunjukkan terdapat penurunan kadar IL-1 β setelah perlakuan. Perbandingan kelompok perlakuan dan kontrol menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Disimpulkan bahwa minyak atsiri temu putih kemungkinan memiliki efek anti inflamasi melalui penurunan kadar IL-1 β makrofag.

Maj Ked Gi Ind. Desember 2015; 1(2): 130 – 135

Kata kunci: minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.), makrofag, kadar IL-1 β

ABSTRACT: IL-1 β level of macrophage exposed to *A. actinomycetemcomitans* decreases after administration *Curcuma Zedoaria volatile oil*. Activation of interleukin-1 β (IL-1 β) is a key regulator of the inflammatory response. Macrophage is a phagocytic mononuclear cell that plays an important role in innate and adaptive immune response. The cytokine secreted by macrophages in response to pathogen are IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α and chemokine. *Curcuma zedoaria volatile oil* may have anti inflammation effect. The aim of this study was to investigate IL-1 β level of macrophage exposed to *A. actinomycetemcomitans* after administration *Curcuma zedoaria volatile oil*. The subjects were 10 male Wistar rats, which divided into two groups (treatment and control), each group 5 rats. In the treatment group, 30,6 μ l/ml *Curcuma zedoaria volatile oil* was administered per oral for 14 days and the control group used aquabidest. In the 7th days, 100 μ l *A. actinomycetemcomitans* in CMC 2% were applied on the anterior gingival mandible for 7 days. Rats were anesthetized in the 15th days then macrophage was collected from peritoneal. Interleukin-1 β level of macrophage was measured using *ELISA kit* (R&D Systems, USA). Data were analyzed using t-test. The result showed IL-1 β level decreased after treatment. The comparison between treatment and control was significant difference ($p < 0.05$). It can be concluded that *Curcuma zedoaria volatile oil* may have anti inflammation effect through reducing the IL-1 β level of macrophage.

Maj Ked Gi. Ind. Desember 2015; 1(2): 130 – 135

Keywords: *Curcuma zedoaria volatile oil*, macrophage, IL-1 β level

PENDAHULUAN

Makrofag merupakan satu dari tiga tipe sel fagosit pada sistem imun dan terdistribusi secara luas pada jaringan tubuh. Sel ini memegang peranan penting pada imunitas *innate* dan *adaptive* serta diketahui sebagai bentuk *mature* dari monosit. Monosit beredar dalam sirkulasi dan berdiferensiasi secara terus-menerus menjadi makrofag. Sel

makrofag tersebut akan menetap di jaringan (histiosit). Makrofag diketahui lebih aktif dalam melakukan fagositosis dibandingkan monosit dan lebih banyak memiliki granula dengan kandungan enzim hidrolitik.¹ Makrofag dan neutrofil merupakan garis pertahanan pertama sistem imun *innate* terhadap mikroorganisme dan berperan penting untuk mengontrol infeksi bakteri.²

Mikroorganisme seperti bakteri yang berpenetrasi ke permukaan epithelial tubuh, pertama kali akan dihadapi oleh sel maupun molekul yang berperan pada respons imun *innate*. Fagositosis makrofag bertanggungjawab sebagai pertahanan terhadap bakteri, atau dapat diartikan reseptor permukaan memiliki kemampuan untuk mengenali maupun berikatan dengan komponen permukaan bakteri. Ikatan molekul bakteri dengan reseptor akan memicu makrofag untuk menelan *bacterium* juga menginduksi sekresi molekul aktif biologis. Makrofag yang teraktivasi tersebut akan mensekresikan protein yang dilepaskan oleh sel akibat teraktivasi atau yang disebut sitokin. Makrofag terutama berperan dalam fagositosis tahap infeksi kronis serta memiliki fungsi sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) kepada limfosit. Proses ini diperlukan untuk inisiasi respons imun adaptif dari *host*. Sitokin dan kemokin yang dilepaskan oleh makrofag sebagai respons terhadap komponen bakteri akan menginisiasi proses inflamasi.^{3,4}

Sitokin merupakan protein berukuran kecil (~25 kDa) yang dilepaskan oleh berbagai sel sebagai respon terhadap aktivasi stimulus dan induksi respon melalui ikatan terhadap respon spesifik. Sitokin tersebut dapat beraksi secara *autocrine* sehingga mempengaruhi lingkungan pada sel yang melepaskannya, atau secara *paracrine* dengan berpengaruh terhadap sel lain di sekitarnya. Beberapa sitokin juga dapat beraksi secara *endocrine* yang berpengaruh terhadap lingkungan sel di sekitarnya meskipun kemampuannya tergantung saat memasuki sirkulasi maupun waktu paruhnya (*half-life*). Makrofag memiliki kemampuan mensekresikan beberapa sitokin sebagai respons terhadap patogen antara lain interleukin 1 (IL-1) interleukin-6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dan kemokin IL-8.^{4,5}

Temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) telah banyak diketahui khasiatnya baik secara tradisional maupun untuk pengobatan kanker. Beberapa khasiat temu putih antara lain sebagai bahan utama jamu sesudah melahirkan, juga sebagai stomatikum, karminativum, tonikum, penawar gigitan ular, serta pengobatan luka dan ulser. Rimpang dan minyak atsiri temu putih mengandung sejumlah senyawa seskuiterpen termasuk kurkumin dan derivat-

derivatnya. Minyak atsiri rimpang temu putih berupa cairan kental kuning emas dengan kandungan 1) monoterpen hidrokarbon (α -pinen, D-kamfen), monoterpen alkohol (D-borneol), monoterpen keton (D-kamfor), monoterpenoksida dan sineol, dan 2) seskuiterpen golongan: bisabolan, elemen, germakran, eudesman, guaian dan spiro lakton.⁶ Kandungan minyak atsiri pada *Curcuma zedoaria* juga dilaporkan berupa 1,8 *cineol* (18.5%), *cymene* (18.42%), α -*phellandrene* (14.9%).^{6,7}

Beberapa hasil penelitian mengemukakan bahwa komponen ekstraksi metanolik temu putih yang berefek sebagai anti inflamasi adalah *furanodiene* dan *furanodienone*. Penelitian tersebut dilakukan dengan induksi inflamasi pada telinga tikus.⁷ Fraksi polisakarida temu putih dosis 1 mg/ml diketahui dapat meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag peritoneal RAW 264.⁸ Daya antimikroba ekstrak temu putih pernah diteliti oleh Bugno pada dosis 100 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml dan 1000 mg/ml terhadap *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*.⁹

Aktivitas anti inflamasi minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoaria*, Rosc.) terhadap udem buatan pada tikus putih betina galur Wistar diketahui pada dosis 400 mg/kg BB.¹⁰ Pemberian minum minyak atsiri temu putih setiap hari sebanyak dosis 30,6 μ l/ml selama 14 hari menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis neutrofil pada tikus putih yang diinduksi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.¹¹ Penelitian Naz dkk.¹² menyebutkan pada dosis minyak atsiri temu putih 28 mg/ml atau setara dengan 30,6 μ l/ml, telah menunjukkan daya antimikroba temu putih terhadap *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus licheniformis* dan *Azotobacter* pada konsentrasi berkisar 4-28 mg/ml *in vitro*. Minyak atsiri temu putih juga dapat menurunkan inflamasi gingiva ditandai dengan penurunan ekspresi CD4⁺.¹³ Penelitian selanjutnya juga menyebutkan opsonisasi serum mampu meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag yang telah diinduksi minyak atsiri temu putih.¹⁴

Aggregat bakteri *actinomycetemcomitans* atau *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) sebagai bakteri Gram-negatif fakultatif non-motil berbentuk

batang dan termasuk kategori komensal di rongga mulut. Bakteri tersebut dapat diidentifikasi dari plak gigi, poket periodontal maupun sulkus gingiva. Keadaan infeksi *endocarditis*, *brain abscesses* dan penyakit periodontal diduga berkaitan dengan bakteri Aa. Induksi bakteri maupun produknya dapat menstimulasi keadaan inflamasi. Keadaan inflamasi jaringan mukosa rongga mulut akibat infeksi bakteri akan menginisiasi untuk aktivasi sel-sel pertahanan rongga mulut.¹⁵ Permasalahannya adalah belum diketahui kadar IL-1 β makrofag terpapar *A. actinomycetemcomitans* setelah pemberian minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) sehingga diharapkan hasil penelitian ini dapat memberi informasi ilmiah salah satu mekanisme anti inflamasi minyak atsiri temu putih.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini termasuk kategori penelitian eksperimental murni yang telah dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu - Universitas Gadjah Mada (LPPT-UGM). Persetujuan etik penelitian diperoleh dari Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta melalui surat No.301/KKEP/FKG-UGM/EC/2012. Rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe) dideterminasi di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM (No.BF/189/Ident/Det/VI/2012). Destilasi minyak atsiri temu putih dilakukan di LPPT-UGM dengan hasil 3 ml minyak atsiri konsentrasi 100% diperoleh dari rimpang temu putih sebanyak 2833 gram.

Subjek penelitian sebanyak 10 ekor tikus Wistar jenis kelamin jantan usia 3 bulan dibagi menjadi 2 kelompok, 5 ekor tikus pada masing-masing kelompok. Pemberian minum minyak atsiri temu putih dosis 30,6 μ l/ml dilakukan pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol diberi minum aquabides sebanyak 1 ml selama 14 hari.

Bakteri *A. Actinomycetemcomitans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Bakteri dengan konsentrasi $\pm 1 \times 10^9$ sel/ml dalam keadaan hidup dicampurkan dengan *Carboxymethyl Cellulose Sodium* (CMC) (MP Biomedical, Inc) konsentrasi 2%. Pembuatan campuran *A. actinomycetemcomitans*

dalam CMC 2% dilakukan setiap pagi hari pada saat akan dioleskan. Pengolesan campuran *A. actinomycetemcomitans* dalam CMC 2% sebanyak 100 μ l dilakukan selama 7 hari pada gingiva anterior rahang bawah baik kelompok perlakuan maupun kontrol.

Prosedur selanjutnya dilakukan koleksi makrofag pada hari ke-15 dengan diawali anestesi menggunakan Ketamin hidroklorida 10% (Ketamil[®]) dosis 100 mg/kg berat badan secara intramuscular. Metode koleksi makrofag dari peritoneal telah dipublikasikan sebelumnya oleh Handajani¹⁴ dengan cara pembuatan irisan kecil pada perut subjek sampai tampak peritoneum. Medium RPMI yang mengandung 2% FBS disuntikkan sebanyak 10 ml ke dalam rongga peritoneum lalu ditunggu selama 2 menit sambil ditekan secara perlahan. Cairan peritoneal diambil dengan aspirasi dari rongga peritoneum di daerah kuadran kiri bawah abdomen. Aspirat yang diperoleh selanjutnya ditampung dalam tabung lalu disentrifugasi pada 1.200 rpm, 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang lalu pelet ditambahkan 3 ml medium RPMI sebanyak 3 ml.

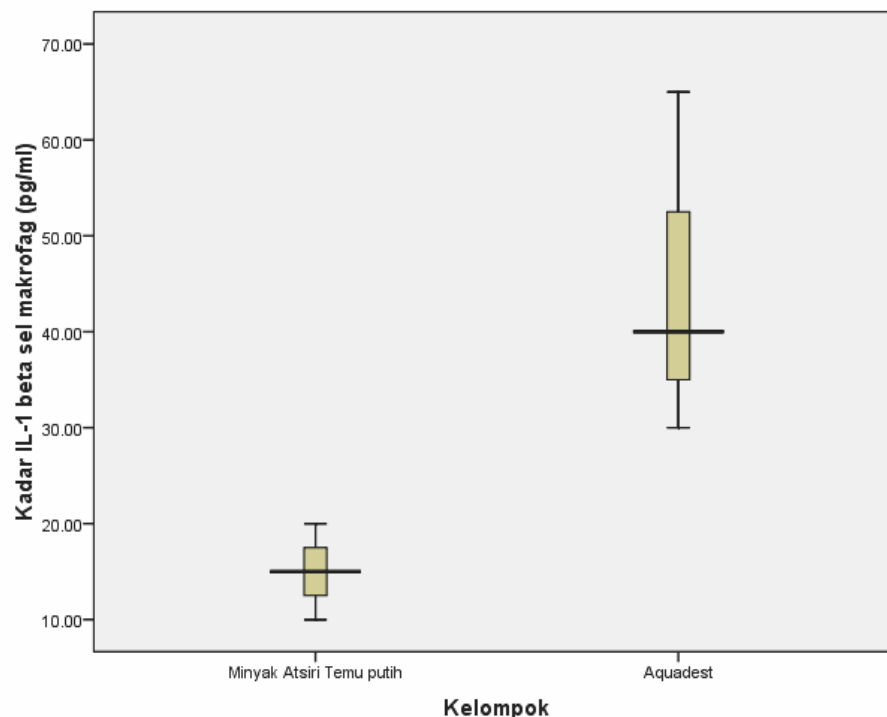
Penghitungan viabilitas sel dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang telah diwarnai larutan *trypan blue* dan menggunakan *hemocytometer*. Makrofag yang *viable* (hidup) terlihat bening atau tidak berwarna karena *trypan blue* tidak dapat memasuki membran sel sedangkan makrofag mati akan menyerap warna sehingga tampak berwarna biru.¹⁶

Prosedur selanjutnya pelet diresuspensi dengan medium RPMI sehingga diperoleh suspensi makrofag dengan kepadatan sebanyak $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Penanaman suspensi sel dalam *microplate* 24 well yang dasar *platenya* telah diberi *coverslip* bulat. Setiap sumuran diisi suspensi sel sebanyak 200 μ l ($2,5 \times 10^5$ sel). *Microplate* diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C 5% CO₂ selama 30 menit lalu ditambahkan media RPMI sebanyak 1 ml tiap sumuran, selanjutnya inkubasi lagi selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali kemudian ditambahkan medium RPMI sebanyak 1 ml tiap sumuran dilanjutkan inkubasi lagi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengukuran kadar IL-1 β makrofag menggunakan *ELISA kit* (R&D Systems, USA). Absorbansi dibaca menggunakan *ELISA reader*

pada 450 nm. Kadar IL-1 β ditentukan melalui intrapolasi dari kurve standar.

HASIL PENELITIAN

Hasil perhitungan viabilitas menunjukkan 95% sel *viable* (hidup). Hasil rerata dan standar deviasi kadar IL-1 β makrofag (pg/ml) setelah pemberian minum minyak atsiri temu putih dan kontrol selama 14 hari ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Rerata dan standar deviasi kadar IL-1 β makrofag setelah pemberian minyak atsiri temu putih (perlakuan) dan aquades (kontrol)

Hasil perhitungan normalitas data kadar IL-1 β makrofag menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan $p > 0,05$ dan hasil uji varians menggunakan *Levene's test* menunjukkan $p = 0,101$ ($p > 0,05$), hal ini berarti data terdistribusi normal dan varians data kedua kelompok sama. Selanjutnya dilakukan uji t tidak berpasangan (*independent t-test*) pada kemaknaan 95% dengan hasil $p = 0,049$. Hasil tersebut dapat diinterpretasikan bahwa pemberian minum minyak atsiri temu putih selama 14 hari menunjukkan bermakna menurunkan kadar IL-1 β makrofag apabila dibandingkan kontrol (aquades).

PEMBAHASAN

Makrofag merupakan sel fagosit yang berperan menelan (*engulf*) dan melakukan digesti (*digest*) debris seluler, substansi asing maupun mikroorganisme. Sel tersebut berperan penting pada imunitas *innate* juga membantu menginisiasi mekanisme spesifik pada imunitas *adaptive*. Pada proses inflamasi, makrofag memiliki 3 fungsi utama yaitu *antigen presentation*, fagositosis, dan immunomodulasi melalui produksi berbagai sitokin

dan *growth factor*. Makrofag juga memiliki peran penting pada inisiasi, *maintenance* dan resolusi inflamasi. Sel tersebut dapat diaktifkan maupun dinonaktifkan dalam proses inflamasi. Sinyal aktivasi meliputi sitokin (*interferon gamma*, *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*, dan *tumor necrosis factor alpha*), lipopolisakarida bakteri, matriks protein ekstraseluler, mediator kimiawi lainnya. Penghambatan inflamasi melalui deaktivasi mediator dan sel efektor inflamasi yang memungkinkan *host* untuk memperbaiki jaringan.¹⁷

Hasil penelitian menunjukkan kadar IL-1 β kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan (Gambar 1). Hal ini menunjukkan induksi agregat bakteri *actinomyces comitans* mampu meningkatkan kadar IL-1 β pada reaksi inflamasi.¹⁸ Pada hasil perhitungan statistik diperoleh berbeda bermakna perbandingan kelompok kontrol dengan perlakuan ($p < 0,05$).

Hasil kadar IL-1 β kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kontrol diduga berkaitan dengan telah terjadinya penurunan keadaan inflamasi. Mekanisme penurunan inflamasi kemungkinan karena peran minyak atsiri temu telah meningkatkan (menstimulasi) respons imun tubuh melalui pemberian minum selama 14 hari sehingga pada saat bakteri dipaparkan, aktivasi makrofag telah meningkat untuk melakukan fagositosis. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa minyak atsiri temu putih meningkatkan aktivitas fagositosis baik makrofag maupun neutrofil.^{11,14} Peningkatan respons imun tubuh kelompok perlakuan diduga karena minyak atsiri temu putih efektif untuk meningkatkan produksi TNF- α . Protein tersebut mampu mengaktivasi makrofag untuk melakukan proses penelanan mikroorganisme dengan cara memacu *pathway respiratory burst-dependent* dan *NO-dependent killing*.¹⁹

Mekanisme lain yang diduga menyebabkan lebih rendahnya kadar IL-1 β kelompok perlakuan dibandingkan kontrol yaitu minyak atsiri temu putih adalah induksi pelepasan TGF- β 1. Peran TGF- β 1 diketahui dapat menghambat aksi sel T antara lain menghambat sekresi interleukin-1 dan IL-2-*dependent* proliferasi sel T, menghambat aktivasi sel T *helper* dan sel T sitotoksik.²⁰ Hasil ini diperkuat dengan pemeriksaan histologis jaringan gingiva kelompok perlakuan setelah pemberian minum minyak atsiri temu putih yang menunjukkan ekspresi CD4⁺ positif lemah di lamina propria.¹³ Sesuai hasil penelitian Seymour *et al.*²¹ bahwa terdapat penurunan sel CD4⁺ pada jaringan gingiva yang sudah mengalami penyembuhan (*recovery*) setelah inflamasi. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri temu putih kemungkinan memiliki efek anti inflamasi melalui penurunan kadar IL-1 β makrofag.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Fakultas Kedokteran Gigi – Universitas Gadjah Mada yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana Masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Phillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2013. H. 50-5.
2. Samaranayake L. Essential microbiology for dentistry. 4rd ed. Hongkong: Elsevier; 2012. H. 100-15.
3. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. Immunobiology: The immune system in health and disease. 7th ed. New York: Garland Science; 2008. H. 2.19-2.20.
4. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2010. H. 35-50.
5. Eales LJ. Immunology for life scientist. 2nd ed. England: Wiley; 2003. H. 90, 216-224.
6. Sunardi C, Dewi PNL, Sutedja L, Kardono LBS. Studi aktivitas antimikroba minyak atsiri dari rimpang *Kaempferia rotunda* L., *Curcuma zedoaria* Rosc. dan *Curcuma mangga* Val. Et ZIJP. Dalam: Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI. Surabaya: 27-28 Maret 2002.
7. Makanabe H, Maru N, Kuwabara A, Kamo T, Hirota M. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*, <http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200501/ai_n9474296. 2006> 18 Maret 2008.
8. Carvalho FR, Vassão RC, Nicoletti MA, Maria D, Carvalho FR. Effect of *Curcuma zedoaria* crude extract against tumor progression and immunomodulation. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010; 16(2): 326-41.
9. Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by

- linear regression compared with commercial mouthrinses. *Braz J Microbiol.* 2007; 38(3): 427-32.
10. Kaushik ML, Jalalpure SS. Antiinflammatory efficacy of *Curcuma zedoaria* Rosc root extract. *Asian J Pharm Clin Res.* 2011; 4(3): 90-2.
 11. Handajani J. Temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc., Zingiberaceae) volatile oil increased phagocytic activity of neutrophils exposed to *A. actinomycetemcomitans*. *Proceeding The International Symposium on Oral and Dental Sciences*, 17-18 Januari 2013.
 12. Naz S, Jabeen S, Iyas S, Manzoor F, Aslam F, Al A. Antibacterial activity of *Curcuma Longa* varieties against different strains of bacteria. *Pak J Bot* 2010; 42(1): 455-62.
 13. Handajani J. Minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc., Zingiberaceae) menurunkan ekspresi CD4⁺ pada gingiva terpapar *A. actinomycetemcomitans*. *Maj Ked Gi*, 2013; 20(1): 9-12.
 14. Handajani J. Efek opsonisasi serum terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag terpapar agregat bakteri *A. actinomycetemcomitans* setelah pemberian minyak atsiri Temu Putih. *Dentika Dent J.* 2013; 17(3): 217-222.
 15. Aberg CH, Sjödin B, Lakio L, Pussinen PJ, Johansson A, Claesson R. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16- year clinical and microbiological follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(10): 815-22.
 16. Bio Research. Protocol for performing a trypan blue viability test technical reference guide <<http://bio.lanza.com>> 24 November 2012.
 17. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4(3): 281-6.
 18. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev.* 2009; 60(1): 57-64.
 19. Jang MK, Lee HJ, Kim JS, Ryu JH. A curcuminoid and two sesquiterpenoids from *Curcuma zedoaria* as inhibitors of nitric oxide synthesis in activated macrophages. *Arch Pharm Res.* 2004; 27(12): 1220-5.
 20. Tiemessen M, Kunzmann S, Schmidt-Weber C, Garsen J, Bruijnzeel-Koomen C, Knol E, van Hoffen E. Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *Int Immunol.* 2003; 15(12): 1495–504.
 21. Seymour GJ, Taubman MA, Eastcott JW, Gemmell E, Smith DJ. CD29 expression on CD4⁺ gingival lymphocytes supports migration of activated memory T lymphocytes to diseased periodontal tissue. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12(3): 129–34.