

EFEK IMUNOMODULASI SENYAWA FLAVANOID KENCUR (*Kaempferia galanga* Linn) TERHADAP KEMAMPUAN MIKROBISIDAL SEL NETROFIL SECARA *IN VITRO*

Gusti Revilla¹, Yanwirasti¹, Erly Indrama²

1. Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
2. Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
E-mail ; majalahkedokteranandalas@gmail.com

Abstrak

Tujuan penelitian adalah untuk melihat kemampuan *fagositosis netrofil* terhadap mikroba (*Staphylococcus aureus*) dengan menggunakan metode *microbisidal assay*. Objek penelitian adalah sel netrofil yang berasal dari 10 orang dewasa sehat yang dipisahkan dari sel darah lainnya dengan menggunakan ficol. Netrofil di bagi atas dua kelompok yaitu kontrol dan perlakuan. Kelompok kontrol diberi bahan pelarut yang dipakai untuk senyawa flavanoid. Kelompok perlakuan diberi senyawa flavanoid, dibagi lagi menjadi sub kelompok berdasarkan konsentrasi 1, 10 dan 100 µg/ml. Kemampuan mikrobisidal dan fagositosis netrofil setelah diberi flavanoid kencur dihitung dari hasil inkubasi netrofil. Kemampuan penghancuran netrofil terhadap mikroba meningkat setelah mendapat perlakuan dengan konsentrasi secara berturut-turut 1 - 100 µg/ml dengan jumlah total mikroba yang terbunuh $3,98 \times 10^4$; $3,61 \times 10^4$ dan $3,53 \times 10^4$ dibandingkan dengan kontrol yaitu $3,14 \times 10^4$. Kemampuan fagositosis netrofil meningkat setelah mendapat perlakuan pada konsentrasi sampai 1, 10 dan 100 µg/ml berturut-turut yaitu $9,81 \times 10^4$; $9,61 \times 10^4$ dan $8,91 \times 10^4$ dibandingkan dengan kontrol yaitu $8,89 \times 10^4$. Secara statistik peningkatan mikrobisidal (konsentrasi 1 - 100 µg/ml) dan fagositosis netrofil (konsentrasi 1 dan 10 µg/ml) terhadap mikroba bermakna pada $p= 0,05$. Penelitian ini belum mendapatkan konsentrasi maksimal peningkatan efek mikrobisidal dan fagositosis netrofil secara *in vitro* setelah diberi senyawa flavanoid kencur.

Kata kunci : mikrobisidal - stimulator - supresor - netrofil

Abstract

The study aims to investigate the phagocytic ability of neutrophil as a microbicide against *Staphylococcus aureus* by using a microbicidal assay method. Object of the study is neutrophil derived from 10 healthy adults, separated from the whole blood using ficol. Neutrophil was separated into control and treatment groups. Control group was treated with material used to dissolve flavanoid, and treatment group dissolved in flavanoid kencur at concentrations 1, 10, and 100 µg/ml. Microbicidal and phagocytotic activities of neutrophil after treatment were calculated from neutrophil incubation. Neutrophil ability after treatment with concentrations 1, 10, 100 µg/ml to

destroy microbes increased consecutively with the total number of killed microbes at 3.98×10^4 ; 3.61×10^4 and 3.53×10^4 . Control group ability was calculated at 3.14×10^4 . Phagocytic activity of neutrophil increase consecutively at 9.81×10^4 ; 9.61×10^4 and 8.91×10^4 , while the result of control was 8.89×10^4 . Statistically, there are significant increases ($P < 0,05$) of microbicidal and phagocytotic activities of neutrophil by increasing flavanoid concentrations. The study has not established a maximum concentration of flavanoid kencur in increasing the microbicidal and phagocytic of neutrophil in vitro after treatment.

Keywords: microbiosidal - stimulator - suppressor - neutrophil

PENDAHULUAN

Imunomodulasi merupakan bahan yang dapat mempengaruhi kualitas dan intensitas respon imun. Respon imun dapat bersifat non spesifik (alamiah) dan spesifik (adaptif), dengan masing-masing efekturnya berupa humoral dan seluler.^(1,2)

Sebagai efektor seluler dari respon imun non spesifik adalah sel fagosit yang terdiri atas sel fagosit mononuklear/makrofag dan polimorfonuklear/netrofil. Masing-masing sel fagosit akan melakukan fungsinya yaitu memfagositosis benda asing yang masuk ke dalam tubuh.⁽³⁾

Fagositosis merupakan proses eliminasi dari penelanan dan sampai penghancuran partikel asing yang masuk ke dalam tubuh. Proses fagositosis adalah berupa tahap pengenalan yaitu; migrasi, penelanan, degranulasi dan mikrobisidal atau inter seluler killing. Semua tahap dari fagositosis ini dapat diuji kemampuannya secara *in vitro*.^(2,3)

Kemampuan fagositosis dapat berasal dari bahan tertentu baik yang datang dari luar tubuh/ekstrinsik maupun dari dalam tubuh/intrinsik. Bahan ekstrinsik yang dapat mempunyai efek sebagai imunomodulasi dapat berupa obat-obatan, bahan kimia atau dari bahan alam yaitu tanaman obat. Kemampuan imunomodulasi dapat bersifat sebagai imunostimulan (meningkatkan) atau immunosupresi (menurunkan) kemampuan sistem imunitas tubuh. Salah satu bahan alam yang telah diketahui secara empirik sebagai obat adalah kencur.^(2,4,5)

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn) telah di kenal masyarakat Indonesia baik sebagai tanaman obat maupun sebagai bumbu masakan. Sebagai obat kencur yang dipakai untuk mengobati penyakit diantaranya batuk, radang lambung dan bengkak dan penyakit tersebut dikaitkan dengan sistem imun.⁽⁶⁾

Berbagai penelitian efek biologi

kencur dengan pelarut air telah dilakukan yaitu sebagai anti bakteri dan efek imunomodulasi ekstrak air dan metanol terhadap kemampuan fagositosis secara *in vitro*. Penelitian efek imunomodulasi tanaman kencur dilanjutkan dengan melihat efek senyawa aktif kencur yaitu senyawa p-metoksi sinamat etil ester dan flavanoid terhadap kemampuan fagositosis secara *in vitro* dan *in vivo*. Hasil penelitian diketahui bahwa senyawa p-metoksi sinamat dan flavanoid dapat menurunkan kemampuan fagositosis khususnya proses penelanan baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo* jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan kemampuan fagositosis dari kedua senyawa tersebut mungkin dapat dikaitkan dengan penggunaan obat immunosupresi diantaranya kortikosteroid, diketahui bahwa kortikosteroid dapat mengurangi kemampuan fagositosis pada tahap penelanan, migrasi dan mikrobisidal. Untuk itu dilanjutkan penelitian efek senyawa-senyawa flavanoid terhadap kemampuan mikrobisidal atau intra seluler killing sel netrofil secara *in vitro*.⁽⁷⁻¹²⁾

Untuk menguji kemampuan mikrobisidal sel netrofil setelah di beri senyawa flavanoid digunakan metode mikrobisidal assay. Prinsip metode ini adalah melihat kemampuan netrofil untuk membunuh/menghancurkan mikroba yang juga dapat membedakan fungsi penelanan dengan fungsi pembunuhan/penghancuran mikroba.

Sel netrofil dipisahkan dari sel lainnya dengan menggunakan ficol dan sel netrofil harus dalam kondisi hidup. Sebagai indikator/mikrobanya biasanya digunakan bakteri *Staphylococcus aureus*, namun bakteri lain dapat dipakai diantaranya bakteri katalase negatif yang dapat membantu diagnosis akhir dari penyakit *Chronic Granulomatous Disease* (CGD). *S. aureus* dipakai karena mikroba

ini mudah didapatkan dan sering dipakai dalam penelitian.^(12,13)

Kemampuan mikrobisidal ini merupakan suatu proses yang multifase yang memerlukan integritas faktor ekstra seluler (komplemen dan anti bodi sebagai opsonin) dan intra seluler (integritas metabolik yang utuh dari sel netrofil). Pemeriksaan ini berperan dalam pengujian disfungsi dari netrofil dan pada diferensiasi anti bodi spesifik atau komplemen.⁽²⁾

METODOLOGI PENELITIAN

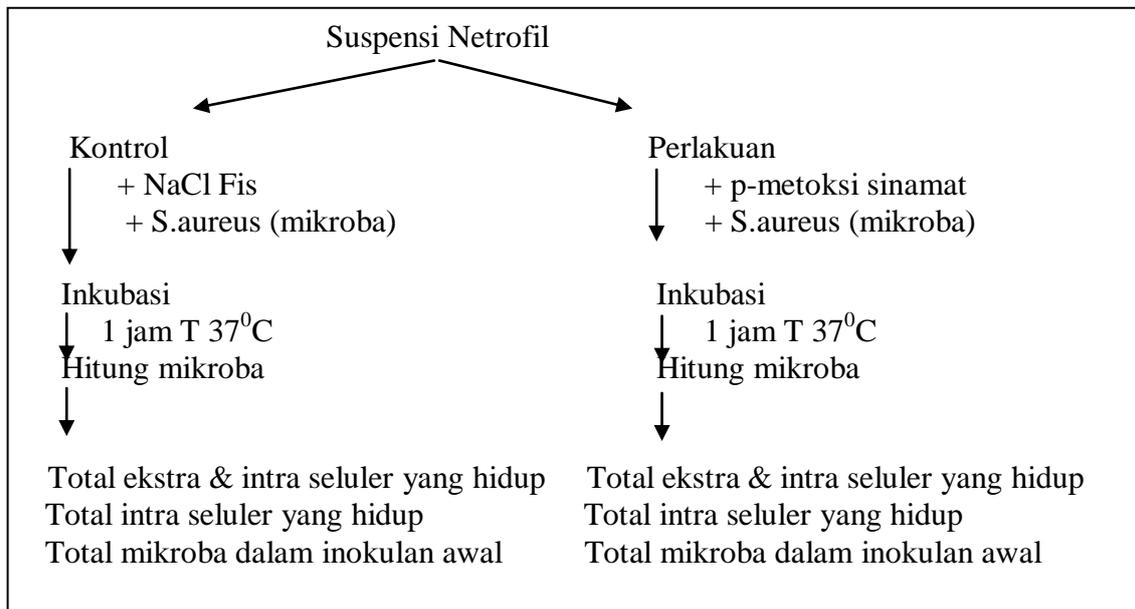
Penelitian merupakan eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan di bagi atas 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Sebagai subjek penelitian adalah netrofil manusia sehat yang dipisahkan dari sel darah lainnya dengan menggunakan ficol.

Suspensi Netrofil

Netrofil diperoleh dari darah manusia dari pembuluh vena sebanyak 10 ml dan diberi heparin. Darah yang didapatkan diencerkan dengan dektran T. 500 perbandingan 2 : 1, dibiarkan selama 30 menit. Supernatan yang telah didapatkan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang telah di beri ficol, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit kemudian di cuci dengan RPMI sebanyak 2 kali. Sel netrofil yang didapatkan di hitung sebanyak 5×10^6 sel/ml.

Pembuatan senyawa flavanoid

Flavanoid kencur dipisahkan dari senyawa lainnya dengan menggunakan metode Markham. Pembuatan senyawa ini dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam FMIPA UNAND Padang. Senyawa



Bahan yang diperlukan:

- Suspensi netrofil.
- Senyawa flavanoid kencur.
- Suspensi *Staphylococcus aureus*.
- Serum.

flavanoid yang akan dipakai dalam eksperimen dilarutkan dengan NaCl fisiologis dengan beberapa konsentrasi yaitu 1,10 dan 1000 µg/ml. Kadar yang digunakan untuk setiap perlakuan adalah 100 µl. Suspensi *Staphylococcus aureus*.

1. Kuman *S.aureus* didapatkan dari stock culture.
2. Kuman di tanam ulang ke agar darah dalam inkubator suhu 37⁰C selama 18 – 24 jam.
3. Koloni kuman disuspensi dengan NaCl fisiologis dan hitung kuman dengan menggunakan bilik hitung.
4. Suspensi yang digunakan adalah 5 x 10⁸ sel/ml.

Serum

Serum yang digunakan berasal dari darah yang sama dari serum yang sudah di simpan dalam freezer (-20⁰C) serum dicampur dengan perbandingan 1 : 1.

Cara kerja

1. Pada donatur sebelum di ambil darah, diberikan informed consent dan dilakukan pada pemeriksaan darah rutin.
2. Untuk kelompok perlakuan suspensi kuman 0,5 ml, 0,4 ml suspensi netrofil, 0,1 ml serum dan senyawa p-metoksi sinamat konsentrasi bertingkat yaitu 1,10 dan 100 µg/ml dimasukkan dalam tabung yang bertutup ulir sehingga tercampur dan untuk kelompok kontrol campuran lainnya sama tetapi senyawa p-metoksi sinamat diganti dengan NaCl fisiologis.
3. Campuran dari kedua kelompok tersebut diinkubasi dalam pemanas air pada suhu 37⁰C selama 1 jam sambil di goyang-goyang.
4. Setelah diinkubasi, diambil 0,1 ml campuran tersebut ditambahkan 1,9 ml aquades. Buat pengenceran 10x secara serial lalu sebanyak 0,1 ml suspensi dengan pengenceran 10⁻³ dan 10⁻⁴ dibiakkan dalam media untuk mendapatkan jumlah total kuman hidup (intra dan ekstra seluler). Hasil yang didapatkan berupa merupakan jumlah kuman total yang hidup diberi kode C.
5. Ke dalam tabung dimasukkan 0,1 ml suspensi awal ditambahkan lyosta-

phin, lalu campuran inkubasi kembali dalam pemanas air suhu 37⁰C selama 20 menit. Setelah 10 menit lalu inkubasi masukkan 0,1 ml. Tripsin 2,5% untuk mengaktivasi lyostaphin. Lalu campuran diinkubasi kembali selama 10 menit. Buat pengenceran 10 kali secara serial dengan menggunakan aquades. Hasil yang didapatkan merupakan jumlah kuman total yang hidup di beri kode B.

6. Untuk mendapatkan jumlah kuman hidup dalam inokulum awal sebanyak 0,5 ml suspensi kuman di campur dengan 0,5 ml TCI 199. Buatlah pengenceran serial 10⁻⁴ sampai 10⁻⁶ lalu sebanyak 0,1 ml. Dari masing-masing dibiakkan. Lempeng agar diinkubasi pada suhu 37⁰C dalam inkubator selama 18 – 24 jam, lalu jumlah koloni di hitung. Jumlah koloni yang dipakai untuk penghitungan adalah berasal dari pengenceran tertinggi. Hasil yang didapatkan merupakan jumlah kuman total yang hidup diberi kode A.
7. Penghitungan dibuatkan dengan rumus:

$$D = A - C$$

$$E = B + D$$

Keterangan

- A = Jumlah mikroba dalam inokulum awal.
 B = Jumlah kuman intra seluler yang hidup.
 C = Jumlah kuman intra dan ekstra seluler yang hidup.
 D = Jumlah kuman intra seluler yang terbunuh.
 E = Jumlah kuman yang terfagositosis.

Analisa Data

Untuk membedakan kemampuan efek mikrobisidal sel netrofil antara kelompok perlakuan dan kontrol digunakan t-test.

HASIL

Efek senyawa flavanid kencur (*Kaempferia galanga* Linn) terhadap ke-

mampuan mikrobisidal dari 10 orang dewasa sehat didapatkan bahwa flavanoid kencur memberikan efek sebagai immunomodulasi. Kemampuan immunomodulasi senyawa flavanoid dapat di lihat pada tabel 1 dan 2.

Efek immunomodulasi yang diberikan oleh senyawa flavanoid kencur pada penelitian ini bersifat positif (stimulator/meningkatkan kemampuan efek mikrobisidal dan proses fagositosis/penelanan) pada perlakuan 1-3 (konsentrasi 1 - 100 µg/ml). Kemampuan immunomodulasi senyawa flavanoid ini dapat dilihat pada tabel 1 dan 2. Pada tabel terlihat bahwa total jumlah kuman (*staphylococcus aureus*) yang terbunuh dan jumlah kuman yang terfagositosis pada kelompok perlakuan 1-3, jumlah mikroba yang terbunuh yaitu: $3,98 \times 10^4$; $3,61 \times 10^4$ dan terfagositosis lebih tinggi yaitu $9,81 \times 10^4$; $9,61 \times 10^4$ dan $8,89 \times 10^4$ dibandingkan dengan kelompok kontrol yaitu : $3,14 \times 10^4$ atau $8,89 \times 10^4$.

Hasil analisa statistik terhadap jumlah kuman yang terbunuh dan jumlah kuman yang tertelan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1 dan 2 yang di beri senyawa flavanoid kencur pada $p = 0,01$.

Tabel 1. Jumlah *Staphylococcus aureus* yang terbunuh oleh netrofil setelah di beri senyawa flavanoid kencur

No	£ mikroba yang terbunuh pada kelompok (10^4)			
	Kontrol	P.1	P.2	P.3
1	8	19	46	7
2	11	31	26	11
3	39	19	14	26
4	24	34	10	14
5	11	60	22	46
6	29	36	43	39
7	61	53	70	74
8	26	55	69	65
9	90	60	31	51
10	15	31	30	31
£	314	398	361	353

Keterangan:

- Kontrol = Diberi NaCl fisiologis.
- P.1 = Diberi senyawa flavanoid konsentrasi 1 mg/ml.
- P.2 = Diberi senyawa flavanoid konsentrasi 10 mg/ml.
- P.3 = Diberi senyawa flavanoid konsentrasi 100 mg/ml.

Tabel 2. Jumlah *Staphylococcus aureus* yang terfagositosis oleh netrofil setelah di beri senyawa flavanoid

No	£ mikroba yang terfagositosis pada kelompok (10^4)			
	Kontrol	P.1	P.2	P.3
1	28	35	79	19
2	24	73	42	23
3	80	39	81	43
4	51	91	34	49
5	67	137	86	86
6	93	99	114	118
7	167	128	138	146
8	122	118	117	156
9	164	142	115	107
10	93	119	155	144
£	889	981	961	891

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa kemampuan netrofil setiap subjek berbeda dalam membunuh dan memfagosit/menelan kuman (Tabel 1 dan 2). Perbedaan ini menunjukkan bahwa setiap orang mempunyai kemampuan imunitas yang berbeda.

Efek imunomodulasi yang diberikan oleh senyawa flavanoid kencur pada penelitian bersifat positif (stimulator yang meningkatkan kemampuan efek mikrobisidal dan fagositosis/penelanan) pada kelompok perlakuan 1 - 3 (konsentrasi 1,10 dan 100 µg/ml). Sifat stimulator senyawa flavanoid ini menurun cukup banyak sesuai peningkatan konsentrasi.

Pada konsentrasi yang tinggi terdapat perbedaan dengan penelitian efek imunomodulasi lain yang telah dilakukan terhadap kemampuan proses fagositosis di antara penelanan baik secara *in vitro* (sel netrofil) dan *in vivo* (tikus percobaan) karena senyawa flavanoid kencur bersifat sebagai supresan. Keadaan ini mungkin disebabkan karena konsentrasi flavanoid jauh lebih tinggi yaitu 100, 150 dan 200 µg/ml. Pada penelitian ini diberikan konsentrasi yang lebih rendah (1 sampai 10 µg/ml), senyawa flavanoid mempunyai efek imunomodulasi namun peningkatan konsentrasi stimulatornya juga menurun. Hal ini menunjukkan bahwa flavanoid mungkin pada konsentrasi yang tinggi perannya terhadap sistem imunitas sudah berkurang dan sudah bersifat sebagai perusak sel karena telah diketahui bahwa flavanoid dalam dosis besar bersifat sebagai oksidan dan keadaan ini tentu akan mempengaruhi baik terhadap sel netrofil maupun pada kuman sendiri.

Efek mikrobisidal merupakan suatu penelitian yang multi kompleks karena banyak faktor yang mempengaruhi, diantaranya adalah sifat opsonin yaitu anti-bodi dan komplemen. Faktor opsonin juga berpengaruh pada proses mikrobisidal ini dan flavanoid mungkin dapat mempenga-

ruhi. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut tentang efek flavanoid terhadap komplemen dan proliferasi dari limfosit (sel T dan sel B).

Pengaruh flavanoid ini sebagai oksidan terhadap sel netrofil tentu menyebabkan sel netrofil akan rusak, sehingga netrofil tidak mampu menjalani fungsinya sebagai fagositosis (menelan dan menghancurkan kuman). Netrofil yang tidak mampu menjalani fungsinya tentu akan mempengaruhi terhadap penurunan jumlah kuman yang terbunuh dan jumlah kuman yang tertelan. Kondisi lain juga dapat mempengaruhi terhadap kuman, mungkin flavanoid juga akan mampu langsung membunuh mikroba khususnya *Staphylococcus aureus*. Penelitian terhadap ekstrak air kencur terhadap pertumbuhan koloni diketahui bahwa kencur dapat menghambat pertumbuhan koloni beberapa mikroba.⁽⁶⁾ Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut tentang efek oksidan dari flavanoid terhadap kuman/mikroba.

KESIMPULAN

1. Senyawa flavonoid kencur bersifat sebagai imunomodulasi terhadap kemampuan mikrobisidal.
2. Konsentrasi 1 - 100 µg/ml senyawa flavanoid memberi efek stimulator terhadap kemampuan mikrobisidal dan penelanan dari sel netrofil, namun peningkatan konsentrasi akan mengurangi kemampuan stimulatornya.
3. Konsentrasi 1 - 100 µg/ml belum menghasilkan sifat stimulator yang maksimal terhadap kemampuan mikrobisidal dan fagositosis secara *in vitro* untuk itu dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan konsentrasi di bawah 1 µg/ml.
4. Peningkatan konsentrasi yang tinggi (lebih dari 100 µg/ml) dari senyawa flavanoid kencur mungkin sudah bersifat oksidan.

Saran

1. Untuk mendapatkan konsentrasi yang maksimal terhadap stimulator flavanoid perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap kemampuan mikrobisidal dan fagositosis secara *in vitro*.
2. Hasil penelitian ini dapat dipakai sebagai dasar untuk pengujian efek imunomodulasi lainnya (diantaranya proliferasi limfosit, aktivitas komplemen dan migrasi sel netrofil) secara efek flavanoid kencur terhadap mikroba.

KEPUSTAKAAN

1. Weir, DM, Stewart, J. Immunology. 7th Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, Tokyo.
2. Stites, DP, Terr, AT., Parslow, TG. Basic and clinical immunology. Eighth edition. Prentice-Hall International Inc. 1994.
3. Fundenberg, HH et al. Basic and clinical immunology. 3th Ed. Lange Medical Publication. Los Altos, California. 1992.
4. Bellanti, JA. Immunologi III. Edisi ke-3. Penerjemah Samik Wahab. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 1993.
5. Wagner, H. 1990. Search for plant derived natural products with immunomodulatory activity (recent advances). Pure & Appl chemical. 62 (1).
6. Astuti, Y., Sundari, D., Winamo, MW. Tanaman kencur, efek farmakologi, fitokimia. Seminar tanaman obat Indonesia. Bandung 1994.
7. Sugondo, U. dkk. Efek anti mikroba dari infusa kaempferia galanga. Makalah dibacakan pada Kongres Nasional IKAFI. Manado. 1986.
8. Gusti, R., Subowo, S., Yatin, W. Pengujian efek ekstrak kencur (*Kaempferia galanga Linn*) terhadap imunomodulasi melalui uji fagositosis netrofil secara *in vitro*. MKA. 20 (1) (2). 1996.
9. Gusti, R., Amir, A., Yanwirasti. Efek imunomodulasi senyawa p-metoksi sinamat dan etil ester dan flavanoid kencur (*Kaempferia galanga Linn*) terhadap fagositosis secara *in vivo* pada tikus Galur Wistar. Kongres Pertemuan Ahli Anatomi Indonesia, Denpasar. 2000.
10. Gusti, R., Yerizel, E. Efek imunologis senyawa p-metoksi sinamat ester dan flavanoid kencur (*Kaempferia galanga Linn*) terhadap kemampuan fagositosis secara *in vitro*. Jurnal Yarsi. 8 (1). Januari – April 2000.
11. Gusti, R. Immunomodulation effect of flavonoid kencur (*Kaempferia galanga Linn*) to the viability on phagocytosis *in vivo*. Kongres International Anatomi (APICA). Kusadasi Turkey 7-9 September 2005.
12. Meuleman, J., Katz, P. The immunologic, effects, kinetics and use of glucocorticoid steroid. Symposium on clinical immunology II. W.B Saunders company, Philadelphia, London, Toronto, Mexico city, Rio de Janeiro, and Tokyo. 1985
13. Wagner, H., Jurcic, K. Assay for immunomodulation and effects on mediators of inflammation. Methods implant biochemistry. Vol. 6. ISBN. 1991.