

EFEKTIFITAS MINYAK ATSIRI LENGKUAS TERHADAP PRODUKSI NITRIT OKSIDA MAKROFAG MENCIT (RAW 264,7) YANG DIINDUKSI *LPS E.coli* in vitro

Regina TC. Tandelilin, Heni Susilowati, Tetiana Haniastuti

Bagian Biologi Mulut
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada

Regina TC. Tandelilin, Heni Susilowati, Tetiana Haniastuti: Efektifitas Minyak Atsiri Lengkuas terhadap Produksi Nitrit Oksida Makrofag Mencit (Raw 264,7) yang Diinduksi *LPS E.coli* in vitro. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2003; 10 (Edisi Khusus): 344-351

Abstract

Based on the content of the galangal's essential oil which can be used as antimicroorganism, analgesic, and antiseptic characterized with inhibiting and destructing microorganism life process, it is predicted that there is a possibility of essential oil can be used for anti-inflammatory agent. Nitric-oxide (NO) is an unstable gas produced by cell such as macrophage and has the function as antimicroorganism. The aim of this study was to investigate whether essential oil of galangal components has an effect to the macrophage NO production, which stimulated by *LPS E. coli*.

The both curative and preventive analysis using ANOVA showed that the NO productions differences were significant ($p < 0,01$). This study showed that the NO levels produced by murine macrophages induced by *LPS E. coli* were suppressed by essential oil in a dose dependent fashion, suggesting anti-inflammatory activities. Curatively, increased doses of the essential oil resulted in increased its anti-inflammatory functions. Five micro liter of the essential oil was preventively the most concentration as anti inflammation.

Key words: *LPS*; Nitric-oxide (NO); ELISA reader

Pendahuluan

Menurut Anonim¹, lengkuas mengandung minyak atsiri (eugenol, sineol, metil sinamat, kadinen, basorin, galangin, khemferid, galanol) dan damar. Guenter² melaporkan bahwa hasil penelitian yang sudah ada, minyak atsiri lengkuas yang diperoleh dengan distilasi merupakan senyawa kimia yang mempunyai efek

fisiologis dan memberikan sifat terapeutik. Kemampuan menghambat dan merusak proses kehidupan di manfaatkan sebagai bakterisid dan fungisid. Dilaporkan oleh Azuma dkk³ bahwa hasil penelitian mereka mengarah pada penghambatan kemotaksis leukosit mungkin terlibat dalam mekanisme aksi anti inflamasi gugus fenol dan salah satu aktivitas gugus fenol adalah mencegah

produksi oksigen yang bebas radikal oleh lekosit.

Inflamasi (radang) terjadi akibat respon jaringan terhadap rangsang fisik atau kimiawi yang merusak. Rangsang ini menyebabkan timbulnya reaksi radang seperti bengkak, panas, warna merah, rasa nyeri dan gangguan fungsi. Dalam proses inflamasi maupun respon imun akan melepaskan berbagai substansi dan fungsi substansi yang dilepaskan dapat dihambat atau didorong oleh bahan-bahan immunosupresor dan immunostimulator baik dari dalam ataupun dari luar tubuh. Immunosupresor dari luar dapat diperoleh diantaranya dari tanaman obat.⁴

Makrofag merupakan komponen yang penting pada perkembangan suatu lesi karena jumlahnya yang sangat besar. Hal ini dapat disebabkan karena makrofag mempunyai beberapa fungsi mediator dan regulator pada respon imun. Makrofag melakukan fungsi fagositosis benda asing tetapi juga dapat memproduksi beberapa substansi biologis aktif seperti enzim, prostaglandin, dan sitokine.^{5,6,7} Substansi biologis aktif tersebut itulah akan sangat membantu makrofag yang dalam tugasnya dapat bekerja sama dengan sel-sel lain seperti limfosit, sel endotel dan sel fibroblast ataupun sel lainnya.⁸

NO (nitrit oksida) merupakan molekul yang unik karena tidak bermuatan listrik dengan elektrode yang tidak berpasangan, mengindikasikan bahwa molekul ini mudah berdifusi melewati membran dan sangat reaktif. Mekanisme sintesis NO masih menjadi bahan perdebatan, meskipun dalam 2 tahun terakhir hal ini sudah mulai terbuka. Didalam solusi, NO teroksidasi menjadi bentuk nitrit dan nitrat.⁹ Nitrit dapat diukur dengan larutan Griess.¹⁰ Nitrat diukur dengan nitrat reduktase atau kadmium.¹¹ Di dalam sistim imun, NO sangat penting sebagai bahan antimikrobia. Sebagai contoh, proteksi hospes terhadap infeksi parasit seperti *Leishmana major* ditentukan oleh level NO, karena pemberian NMLA, penghambat L-arginin, pada mencit yang diinfeksi dengan parasit tersebut akan meningkatkan jumlah parasit didalam hospes dan meningkatkan diameter lesi

kulit.¹² *In vitro*, diketahui pula fungsi antifungisidal sel makrofag mencit terhadap *Candida albicans* dilakukan oleh NO.¹⁰

Lipopolisakarida (LPS) merupakan kompleks glikolipid pada dinding luar bakteri gram negatif, yang berfungsi menimbulkan stimulasi pada sel-sel imun baik *in vitro* maupun *in vivo*. Molekul LPS terdiri atas tiga komponen yaitu inti polisakarida, antigen-O dan lipid A. Bagian inti polisakarida terdapat pada sebagian besar bakteri gram negatif, sedangkan antigen-O merupakan komponen yang menentukan aktivitas serologis LPS yang spesifik, dan lipid A merupakan komponen toksik LPS yang selalu ada dalam setiap genus bakteri.^{13,14} Lipopolisakarida (LPS) merupakan salah satu antigen yang sangat poten menginduksi respon imun. LPS menurut Portillo¹⁵ merupakan molekul amphipathic kompleks yang terletak di dinding luar bakteri gram negatif. Mengandung rantai O, inti terdiri oligosakarida, lemak dan lipid A pada dinding luarnya. LPS yang juga disebut endotoksin adalah unsur utama dari membran luar bakteri gram negatif yang menghasilkan bermacam-macam efek patofisiologi pada manusia dan hewan coba. Sebagian besar efek LPS dapat menyebabkan aktifitas sel target khususnya makrofag. Kemampuan LPS yang diisolasi dari bakteri *S. typhimurium* untuk menginduksi aktivasi sel makrofag yang memproduksi sitokin proinflamasi^{16,17} mengindikasikan bahwa antigen ini mungkin mampu menginduksi sel makrofag memproduksi NO.

Substansi ini mempunyai relevansi klinis yang penting karena berperan langsung dalam patogenesis infeksi bakteri gram negatif.¹⁸ Infeksi LPS pada binatang percobaan dan pada manusia dapat menimbulkan sindroma syok endotoksik fatal, yang bisa berakibat kematian.¹⁹ Pada manusia, LPS mengaktifkan sel-sel monosit dan makrofag untuk memproduksi sitokin, protein adhesi sel dan enzim-enzim yang berfungsi dalam produksi mediator proinflamasi.²⁰

Mekanisme stimulasi LPS pada sel-sel target tergantung pada tipe sel yang digolongkan menjadi dua kelompok, yaitu

sel-sel yang mengekspresikan reseptor membran untuk LPS dan yang tidak.²¹ Kelompok sel pertama meliputi sel-sel mieloid seperti monosit, makrofag, neutrofil²² dan sel-sel mesangial.²³ Kelompok sel ke-2 yaitu sel-sel endotelium, sel-sel epitel²⁴ sel-sel otot²⁵ dan astrosit.²⁶ Kelompok sel ini membutuhkan reseptor solubel LPS untuk pembentukan kompleks LPS-reseptor solubel, yang lebih aktif dibandingkan LPS sendiri.²⁷ Salah satu reseptor LPS adalah antigen monosit CD14 yang dapat ditemukan pada monosit dan makrofag serta sedikit berkurang pada leukosit polimorfonuklear. Menurut Schumann dkk²⁸ dan Wright dkk²⁹ menyebutkan bahwa LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*) berubah konfirmasi setelah interaksi dengan LPS dan kompleks LPS-LBP ini menyatu dengan CD14 untuk aktivasi makrofag.

Penelitian dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh minyak atsiri lengkuas terhadap fungsi makrofag mencit. Adanya pengaruh minyak atsiri lengkuas terhadap fungsi makrofag dengan menguji aktivitasnya melalui proses uji level nitrit oksida (NO), maka diharapkan dapat mengetahui secara ilmiah penggunaan minyak atsiri lengkuas sebagai bahan antiinflamasi.

Bahan dan Metode Penelitian

Uji fungsi makrofag menggunakan induksi LPS- *E. coli*

Sel makrofag mencit (RAW 264.7) disuspensikan dalam larutan RPMI 1640 dengan suplemen 10 % FCS dan 1% antibiotik, pada inkubator 37^o dan 5% CO₂. Setelah penuh sel dipanen dan dihitung, dan suspensi sel ditetapkan berisi 2x10⁵ sel/ml. Minyak atsiri lengkuas dibuat dengan cara distilasi. Untuk mengetahui efek kuratif diuji efektifitas minyak atsiri dalam berbagai konsentrasi (05, 10%, 15%, 20%, 25% dibuat replikasi 5 buah/group) ditambah dengan LPS konsentrasi 100ng dan makrofag masing-masing 200 ul dinkubasi 24 jam, 37^oC dengan 5% CO₂. Kemudian supernatan dipanen dan diukur

kadar NO. Caranya dengan menggunakan larutan Griess yaitu 1,5% sulfonamide (didalam 1 M HCl) dan naphthylene diamine dihidrosiklorida (0,15% dalam air). Sampel supernatan dan larutan Griessmasing-masing 100ul dicampur, diinkubasi dalam ruang gelap 30 menit. Perubahan warna diukur dengan spektrofotometer menggunakan ELISA reader pada 540nm. Sebagai standard digunakan NaNO₂ yang dihasilkan. dibuat grafik standard. Unit absorbansi sampel diplotkan pada grafik tersebut.

Untuk mengetahui efektifitas minyak atsiri secara preventive, maka minyak atsiri berbagai konsentrasi (replikasi 8 buah/group) ditambah makrofag masing-masing 200ul dinkubasi 24 jam, 37^oC dengan 5% CO₂, kemudian sel dipanen, dicuci 3 kali untuk menghilangkan eksek minyak atsiri kemudian ditambah LPS dengan volume yang sama dinkubasi 24 jam, 37^oC dengan 5% CO₂. Supernatan dipanen dan diukur level NO-nya.

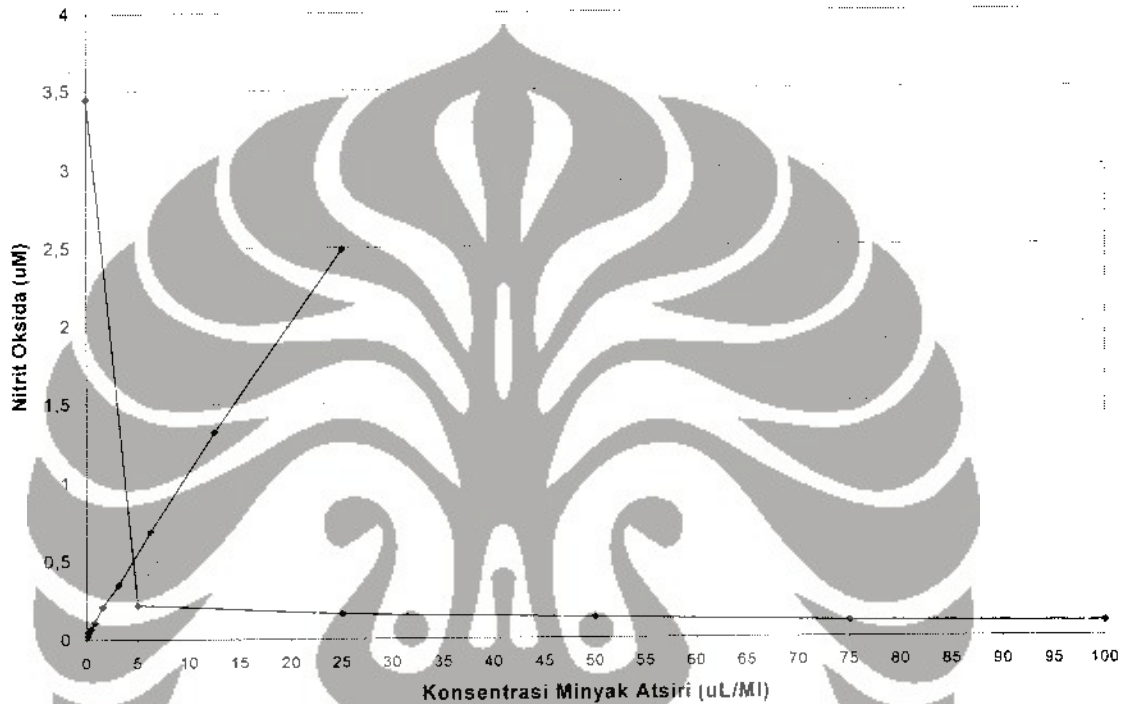
Hasil Penelitian

Tabel 1 merangkum hasil ANOVA guna mengetahui efek kuratif yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna untuk kelima konsentrasi minyak atsiri pada makrofag RAW 264,7 yang telah diinduksi dengan LPS *E. coli* dalam produksi NO dibandingkan dengan kelompok kontrol yaitu makrofag dengan LPS tanpa minyak atsiri. (p<0,01). Kurva produksi NO oleh makrofag yang diinduksi LPS *E. coli* untuk mengetahui efek kuratif minyak atsiri dibandingkan standart NO normal dapat dilihat pada Gambar 1.

ANOVA untuk mengetahui kebermaknaan penurunan produksi NO oleh makrofag RAW 264,7 yang diinduksi LPS *E. coli* dalam uji efek preventif dirangkum dalam Tabel 2. Hasil menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antara kelima kelompok konsentrasi minyak atsiri dengan kelompok kontrol. Gambar 2 menunjukkan hasil produksi NO oleh makrofag yang diinduksi LPS dibandingkan produksi NO standar.

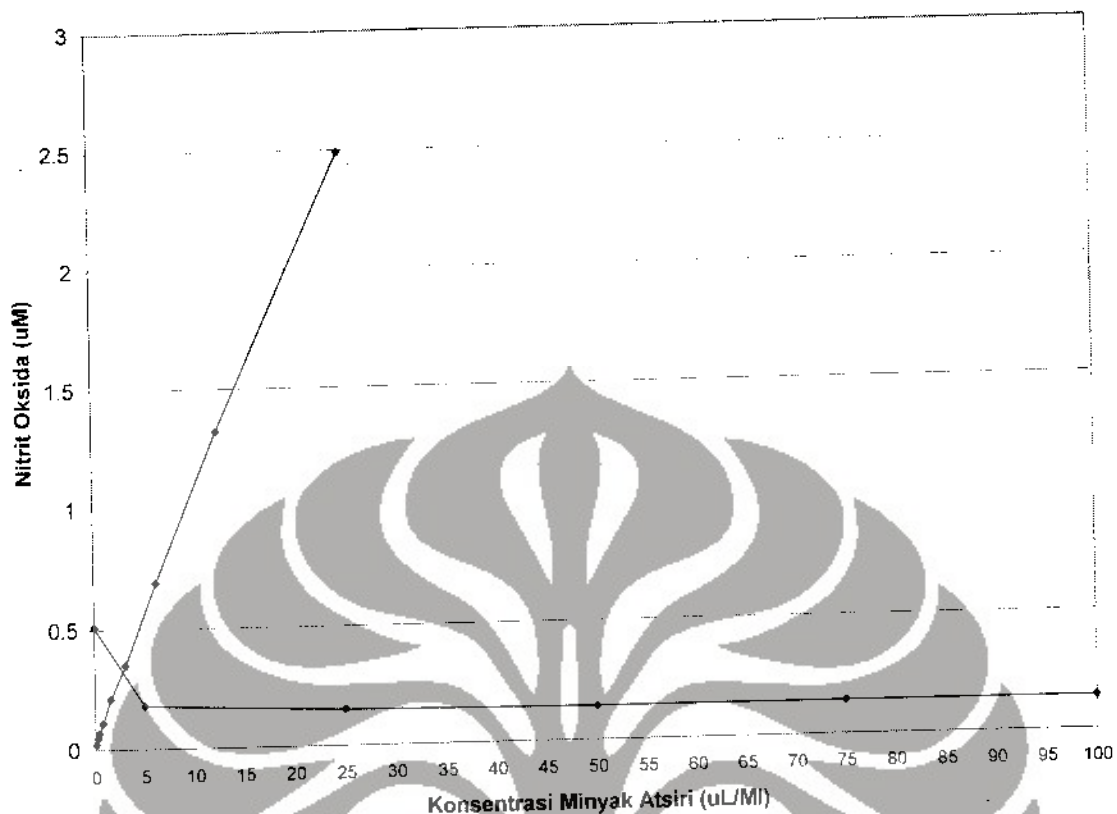
Tabel 1. Hasil ANOVA uji Efek Kuratif Minyak Atsiri

Sumber variasi	Db	JK	RK	F	Sig.
Dalam perlakuan	5	2,267	0,005397	271,498	0,000
Antar perlakuan	47	73,265	14,653		
Total	52	75,532			

Gambar 1. Produksi Nitrit Oksida yang Diinduksi Oleh LPS *E. coli* untuk Efek Kuratif Minyak Atsiri Lengkuas Pada Makrofag RAW 264.7

Tabel 2. Hasil ANOVA uji Preventif Minyak Atsiri Lengkuas

Sumber variasi	db	JK	RK	F	Sig.
Dalam perlakuan	5	0,102	0,00287	51,884	0,000
Antar perlakuan	36	0,736	0,147		
Total	41	75,532			



Gambar 2. Produksi Nitrit Oksida yang Diinduksi Oleh LPS *E.coli* untuk Efek Kuratif Minyak Atsiri Lengkuas Pada Makrofag RAW 264,7

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa minyak atsiri dapat menurunkan level NO. Pada uji efek kuratif, minyak atsiri lengkuas menampakkan bahwa semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri yang digunakan maka semakin besar kemampuannya dalam menekan aktifitas makrofag untuk memproduksi NO yang berperan sebagai mediator inflamasi. Pada uji efek minyak atsiri untuk daya preventif didapat hasil yang menunjukkan bahwa minyak atsiri yang paling rendah (5 μ l/ml) sudah cukup berkhasiat dan penggunaan konsentrasi dengan konsentrasi 25 sampai 100 μ l/ml menampakkan hasil yang sama.

Nitrit oksida dapat diproduksi oleh makrofag baik dalam keadaan fisiologis maupun patofisiologis. Dalam keadaan fisiologis, NO diproduksi sebagai *physiological messenger* untuk komunikasi antar sel, sedangkan dalam kondisi patofisiologis berfungsi sebagai bagian dari sistem imun nonspesifik untuk menghancurkan sel-sel patogen atau sel-sel terinfeksi.^{30,31} Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pada infeksi bakteri, LPS akan dilepaskan dari dinding sel bakteri hingga menstimulasi produksi enzim yang disebut *nitric oxide synthase*.³¹ Telah diketahui bahwa *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) merupakan enzim pada sel-sel mamalia seperti makrofag, hepatosit dan sel-sel endothelial yang berfungsi untuk merubah L-arginin menjadi sitrulin serta NO.^{31,32} Peningkatan produksi

iNOS pada makrofag akan menyebabkan peningkatan level NO, sebaliknya penghambatan stimulasi sel oleh LPS akan diikuti penghambatan produksi iNOS sehingga tidak terjadi peningkatan produksi NO.

Stimulasi LPS pada sel hospes diawali dengan terbentuknya ikatan antara LPS dengan reseptor spesifik pada permukaan membran sel. Pada makrofag, reseptor spesifik untuk LPS adalah CD14, yang berfungsi untuk mengenali kompleks LPS dan LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*). Selanjutnya ikatan antara CD14 dengan kompleks LPS akan menginisiasi sinyal transduksi pada makrofag.¹⁸ Agar tidak terjadi respon imun yang berlebihan maka proses tersebut harus dikendalikan, salah satunya dengan penghambatan stimulasi LPS. Penghambatan ini dapat dilakukan dengan menggunakan antagonis LPS. Lynn dan Golenbock¹⁸ dalam reviewnya menuliskan bahwa antagonis LPS dapat bekerja dengan dua macam cara, yaitu dengan menghambat interaksi antara LPS dengan reseptor, atau berikatan dengan LPS, kemudian menetralkannya. Dengan demikian kedua tipe senyawa antagonis tersebut mempunyai potensi terapeutik untuk penyakit-penyakit yang disebabkan oleh LPS.

Secara pasti mekanisme penghambatan partikel minyak atsiri terhadap produksi gas nitrit belum diketahui. Diduga komponen minyak atsiri lengkuas ini memblok ataupun menghalangi proses pengenalan reseptor CD14 pada makrofag. Dimungkinkan komponen dalam minyak atsiri berfungsi menghambat terbentuknya kompleks LPS-LBP, sehingga tidak terjadi stimulasi yang adekuat untuk menimbulkan respon imunologis. Hal ini dapat terjadi seperti yang dilaporkan oleh Schumann dkk²⁸ dan Wright dkk²⁹ yang menyebutkan bahwa LBP akan menyesuaikan diri setelah berinteraksi dengan LPS membentuk kompleks LPS-LBP yang kemudian menyatu dengan reseptor CD14 untuk aktivasi makrofag. Dimungkinkan pula komponen dalam minyak atsiri lengkuas mampu merusak struktur LPS sehingga

molekul tersebut kehilangan potensinya sebagai *immune-activating agent*.

Hasil yang diperoleh dari studi ini menunjukkan bahwa minyak atsiri lengkuas dapat digunakan untuk menghambat peningkatan produksi NO yang disebabkan oleh stimulasi LPS. Hal ini mengindikasikan bahwa minyak atsiri lengkuas mempunyai potensi terapeutik untuk penyakit-penyakit yang ditimbulkan oleh infeksi gram negatif.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa tingkat produksi NO sebagai mediator inflamasi yang diproduksi oleh makrofag miceit RAW 264,7 dengan induksi LPS *E.coli* dapat ditekan oleh minyak atsiri lengkuas, mengindikasikan aktivitas anti inflamasi. Semakin besar dosis konsentrasi minyak atsiri lengkuas maka daya efek kuratifnya sebagai bahan anti inflamasi semakin besar. Penggunaan konsentrasi 5 ul/ml minyak atsiri lengkuas merupakan konsentrasi yang efektif daya antiinflamasinya dalam fungsi pencegahan.

Daftar Pustaka

1. Anonim. *Materia Medika Indonesia*. Jilid II. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1981.
2. Guenter E. *The Essential Oil*. New York: Van Nostrand, Reinhold Co. 1952: V.
3. Azuma Yamamoto, Oyaza N, Ulda Y, et al. Pharmacological Studies on the Anti-inflammatory Action of Phenolic Compounds. *J Dent Res*, 1986.65 (1): 53-56.
4. Wagner, H. Search for Plant Derived Natural Products with Immunostimulatory Activity. *J. Appl. Chem*. 1990. (62): 1217-1222.
5. Artese L, Plattelli A, Quaranta M, et al. Immunoreactivity for Interleukin 1 β and Tumor Necrosis Faktor- α and Ultrastruktural Features of Monocytes/macrophage in Periapical granuloma. *J. Endon*. 1991. 17: 483-487.

6. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Link et al. Interleukin β in Symptomatic and asymptomatic human periradikuler lesions. *J Endon*. 1994; 20:225-227
7. Wang CY, Stashenko P. Characterization of Bone Resorbing Activity in Human Periapical lesions. *J Endon*. 1993;19: 107-111
8. Bloom. Fawcett. *A Textbook of Histology*. New York: Chapman and Hall. 1994
9. Micking J, Xie Q-W, Nathan C. Nitric Oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 1997; 15 : 323-350
10. Cenci E, Romanil., Mencaci A. et al. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol*. 1993; 23:1034-1038
11. Granger DL, JB Hibbs Jr, LM Broadnass. Urinary nitrate excretion in relation to murine macrophage activation. *J Immunol*. 1991; 146:1294-1302.
12. Liew FY, Millot S, Parkinson C. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginin. *J Immunol* 1990; 144 :4794-4797
13. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8: 217-225.
14. Willett NP. Host-parasite interaction. in Willett NP., White RR, Rosen S. *Essential Dental Microbiology*. Connecticut: Appleton & Lange. 1991; 135-151.
15. Portillo FG, Stein MA., Finlay BB. Release of Lipopolysaccharide from Intracellular Compartment Containing *Salmonella typhimurium* to Vesicles of the Host epithelial Cell. *Infect and Immune*, 1997; 65:24-34
16. Nair BC, Mayberry WR, Dziak R. et al. Biological Effects of purified lipopolysaccharides from *Bacterioides gingivalis*. *J Periodontal Res*. 1983; 18:40-49
17. Roberts FA, Richardson GJ, Michaleck SM. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and *E. coli* lipopolysaccharides on mononuclear phagocytes. *Infect Immun*.1997;65: 3248-3254
18. Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today*, 1992; 13: 271-276.
19. Thomas CJ, Surolia A. Kinetics of the interaction of endotoxin with polymyxin B and its analogs: a surface plasmon resonance analysis. *FEBS-Lett*. 1999; 445: 420-424.
20. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. 1998; 395: 284-288.
21. Tobias PS, Gegner JA, Tapping R. et al. Lipopolysaccharide dependent cellular activation. *J Periodont Res*, 1997; 32: 99-103.
22. Hayashi J, Tamami M, Ichiro S, et al. Soluble CD14 mediates lipopolysaccharide-induced intracellular adhesion molecule 1 expression in cultured human gingival fibroblasts. *J Infect Immun*, 1996; 64:4946-4951.
23. Camussi G, Mariano F, Biancone L. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 modulate the synthesis of platelet-activating factor by human monocytes and mesangial and endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol*, 1995; 155: 316-324.
24. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, et al. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 2744-2748.
25. Loppnow H, Stelter F, Schonbeck U. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *J Infect Immun*, 1995; 63: 1020-1026.
26. Frey EA, Miller DS, Jahr TG. Soluble CD14 participates in the response of cell to lipopolysaccharide. *J Exp Med*.1992; 176: 1665-1671.
27. Gegner JA, Richard JU, Peter ST. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J Biol Chem* 1995;270: 5320-5325.
28. Schumann RL, Steven RL, Gail WF, et al. *Structure and function of lipopolysaccharide binding protein*. *Science*, 1990; 249: 1429-1431
29. Wright SD, Ramos RA., Tobias PS, et al. *J.C. Science* 254 1990:1431-1433
30. Mocada S, Palmer RMJ, Higgs E. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology., *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-142
31. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Solomon H, et al. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994;120:227-237.
32. Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, et al. L-citrulline production from L-arginine by

macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1990, 265:13442-13445.

