

SINTESIS INTERLEUKIN 1 β SEL MAKROFAG MENCIT YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA *E. COLI* DAN MINYAK ATSIRI KENCUR (*Kaempferia galanga* L.) *IN VITRO*

Tetiana Haniastuti*, Heni Susilowati**, Ariadna A. Djais***

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

**Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the essential oil of *Kaempferia galangal* as an anti-inflammatory agent, by evaluating its effect on interleukin 1 β (IL-1 β ???) produced by lipopolysaccharide (LPS) *E. coli* stimulated macrophages. Macrophage cells were stimulated with LPS *E. coli* and essential oil of *Kaempferia galangal* at concentrations of 3 μ l/ml, 1.5 μ l/ml, 0.75 μ l/ml and 0.25 μ l/ml. All of the treatment groups were incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. The concentrations of IL-1 β supernatant were determined by using an enzyme-linked immunosorbent assay kit. Statistical analysis using ANOVA showed significant differences between the treatment groups ($p < 0.05$). This study indicates that the essential oil of *Kaempferia galangal* suppressed IL-1 β produced by LPS *E. coli* stimulated macrophage cells.

Key words: Interleukin 1 β , *Kaempferia galangal*, essential oil, macrophage cell

Pendahuluan

Interleukin (IL) 1 merupakan polipeptida dengan berat molekul 14 sampai 17 kD, yang diproduksi oleh berbagai sel terutama sel makrofag yang teraktivasi oleh substansi-substansi mikroba, kompleks imun atau sitokin-sitokin lain. Terdapat 2 bentuk dari IL-1 yaitu IL-1 α dan IL-1 β yang mengenali reseptor permukaan sel yang sama. Interleukin 1 beraksi pada berbagai sel target yang terlibat dalam respon imunitas maupun inflamasi dan merupakan elemen penting yang mempunyai kemampuan untuk meningkatkan atau menekan respons biologis terhadap infeksi atau inflamasi.¹

Interleukin 1 β merupakan sitokin

proinflamasi predominan yang terekspresi pada gingiva penderita penyakit periodontium.² Jaringan gingiva penderita penyakit periodontal mempunyai kadar IL-1 β lebih banyak dibandingkan dengan jaringan gingiva pada subyek yang sehat. Sitokin tersebut berperan penting dalam patogenesis penyakit periodontium, menyebabkan destruksi jaringan dengan meningkatkan produksi matriks metalloproteinase, menstimulasi terbentuknya osteoklas serta meningkatkan resorpsi tulang.³ Berbagai tipe sel mempunyai kemampuan untuk mensintesis IL-1 β , akan tetapi pada jaringan gingiva penderita penyakit periodontium, sel makrofag merupakan sel utama yang mensintesis IL-1 β secara signifikan.⁴

Lipopolisakarida (LPS) dinding bakteri Gram negatif merupakan komponen bakteri yang memiliki potensi mitogenik untuk menimbulkan perubahan-perubahan imunologis pada jaringan periodontium.⁵ Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Bergman dkk.⁶ menyatakan bahwa LPS *E. coli* mampu menstimulasi sel makrofag untuk mensintesis IL-1 β

Inhibitor IL-1 berpotensi besar bila digunakan sebagai bahan antiinflamasi.⁷ Beberapa obat antiinflamasi misalnya proxen, mempunyai kemampuan untuk menghambat sintesis prostaglandin (PG) E₂ dan IL-1.⁸ Penggunaan obat antiinflamasi nonsteroid tersebut untuk terapi penyakit periodontium, terbukti mampu menghambat destruksi jaringan periodontium.⁹

Kencur merupakan salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia dan sudah lama dikenal masyarakat karena kegunaannya, termasuk untuk pengobatan tradisional. Rimpang kencur mengandung minyak atsiri yang tersusun dari *monoterpenoid*, *sesquiterpenoid* dengan komponen utama *ethylesthercinnamic acid* dan *ethylesther p-methoxycinnamic acid*, *borneol*, *camphene*, *p-methoxystyrene*, λ -*p³-carene*, *n-pentadekane*, *p-methoxystyrene*. Masyarakat luas sering menggunakan rimpang kencur sebagai bahan obat untuk obat batuk, sakit kepala, sakit perut, sakit gigi dan reumatik.¹⁰ Hal tersebut menunjukkan bahwa keluhan-keluhan yang disebabkan oleh inflamasi dapat mereda atau bahkan sembuh setelah menggunakan kencur sebagai bahan obat tradisional. Akan tetapi, sampai saat ini masih sedikit data-data empirik yang mendukung hipotesis tersebut.

Berdasarkan hal-hal tersebut timbul permasalahan apakah minyak atsiri kencur mempunyai efek antiinflamasi? Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas minyak atsiri kencur sebagai bahan antiinflamasi dengan mengetahui pengaruhnya terhadap sintesis IL-1 β sel makrofag mencit yang diinduksi dengan LPS *E. coli*.

Bahan dan Cara Kerja

Sel makrofag yang dipergunakan dalam penelitian ini diperoleh dari hasil isolasi sel makrofag peritoneal mencit Balb/C umur 6-8 minggu. Media kultur 400 μ l yang mengandung (4×10^5) sel makrofag distimulasi dengan LPS *E. coli* konsentrasi 10 μ g/ml dan ditambah dengan minyak atsiri kencur yang diperoleh dengan cara destilasi, dengan konsentrasi 3 μ l/ml, 1,5 μ l/ml, 0,75 μ l/ml,

dan 0,25 μ l/ml. Sebagai kontrol, sel makrofag hanya distimulasi dengan LPS *E. coli* tanpa minyak atsiri kencur. Masing-masing kelompok dibuat replikasi sebanyak 5 kali. Selanjutnya semua kelompok diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂ selama 24 jam, kemudian disentrifugasi dan supernatannya diambil. Supernatan tersebut kemudian disimpan di lemari pendingin dengan suhu -20°C sampai uji IL-1 β akan dilaksanakan. Pengujian kadar IL-1 β supernatan ditentukan dengan menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay kit* (R&D Systems, USA), dengan cara sesuai dengan petunjuk penggunaan pabrik. Konsentrasi IL-1 β ditentukan melalui interpolasi dari kurve standard dengan satuan pg/ml.

Hasil Penelitian

Hasil dari penelitian ini didapatkan data konsentrasi IL-1 β yang diproduksi oleh sel makrofag pada tiap-tiap kelompok. Rerata konsentrasi IL-1 β sel makrofag tersebut terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata dan Deviasi Standar Konsentrasi IL-1 β (pg/ml) tiap- tiap Kelompok

Kelompok	$\bar{x} \pm SD$
I	0.18 \pm 0.33
II	0.42 \pm 0.94
III	0.00 \pm 0.00
IV	0.68 \pm 1.52
V	842.00 \pm 23.87

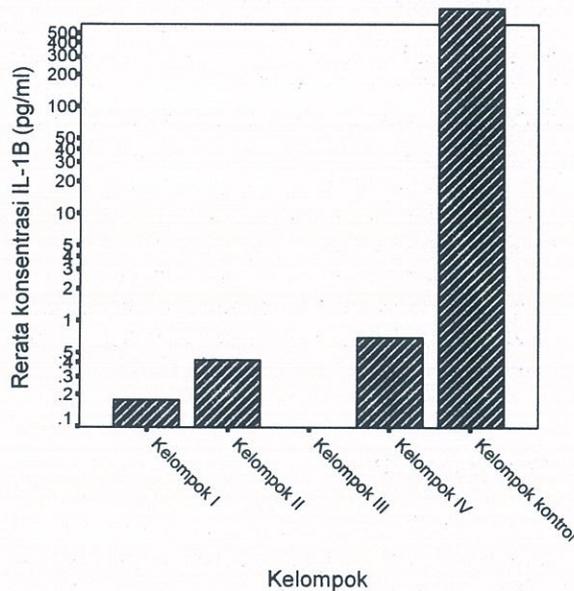
Keterangan:

- I : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 3 μ l/ml
- II : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 1,5 μ l/ml
- III : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 0,75 μ l/ml
- IV : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 0,25 μ l/ml
- V : kelompok kontrol

Pada Tabel 1 terlihat bahwa terdapat penurunan konsentrasi IL-1 β pada semua kelompok yang diberi minyak atsiri kencur baik konsentrasi 3 μ l/ml, 1,5 μ l/ml, 0,75 μ l/ml maupun 0,25 μ l/ml bila dibandingkan kelompok kontrol. Penurunan konsentrasi IL-1 β tersebut diperjelas pada gambar 1.

Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh minyak atsiri kencur terhadap produksi IL-1 β sel makrofag dilakukan analisis dengan menggunakan ANAVA satu jalur, dan perbedaan rerata konsentrasi

IL-1 β antar kelompok dianalisa dengan menggunakan *Least Significant Difference* (LSD).



Gambar 1. Rerata Konsentrasi IL-1 β pada tiap Kelompok

Tabel 2. Rangkuman ANAVA Satu Jalur Pengaruh Minyak Atsiri Kencur Terhadap Produksi IL-1 β Sel makrofag

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	p
Between Groups	2833702.198	4	708425.549	6178.492	.000
Within Groups	2293.199	20	114.660		
Total	2835995.397	24			

Tabel 3. Rangkuman Hasil Uji LSD

Antar kelompok	p
I - II	0,972
I - III	0,979
I - IV	0,942
I - V	0,000
II - III	0,951
II - IV	0,970
II - V	0,000
III - IV	0,921
III - V	0,000
IV - V	0,000

Keterangan:

- I : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 3 μ l/ml
- II : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 1,5 μ l/ml
- III : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 0,75 μ l/ml
- IV : kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 0,25 μ l/ml
- V : kelompok kontrol

Hasil ANAVA (Tabel 2) diketahui bahwa minyak atsiri kencur berpengaruh terhadap produksi IL-1 β sel makrofag ($p < 0.05$). Hasil uji LSD (Tabel 3) diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna konsentrasi IL-1 β antara semua kelompok yang diberi perlakuan dengan minyak atsiri kencur, baik konsentrasi 3 μ l/ml, 1,5 μ l/ml, 0,75 μ l/ml maupun 0,25 μ l/ml bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) antara kelompok yang diberi minyak atsiri kencur konsentrasi 3 μ l/ml, 1,5 μ l/ml, 0,75 μ l/ml dan 0,25 μ l/ml. Data tersebut menunjukkan bahwa minyak atsiri kencur dengan konsentrasi yang paling rendah, yaitu 0,25 μ l/ml sudah mempunyai kemampuan untuk menurunkan sintesis IL-1 β sel makrofag mencit yang diinduksi dengan LPS *E. coli*.

Pembahasan

Pada lesi-lesi inflamasi kronik termasuk pada penyakit periodontal, makrofag merupakan sel yang paling banyak dijumpai. Keberadaan sel makrofag pada lesi tersebut menimbulkan dugaan bahwa sel tersebut berperan penting dalam terjadinya destruksi jaringan pada penyakit periodontal. Hal ini berkaitan dengan kemampuan makrofag dalam memproduksi matriks metalloproteinase, setelah terstimulasi oleh LPS, concanavalin A atau limfokin yang akan meningkatkan produksi sitokin-sitokin termasuk prostaglandin PGE₂ dan IL-1. Sitokin-sitokin tersebut dibutuhkan makrofag untuk menginduksi sintesis matriks metalloproteinase.¹¹

Berbagai produk bakteri terutama LPS, termasuk LPS *E.coli* mempunyai kemampuan menstimulasi makrofag untuk mensintesis IL-1 β ¹² Menurut Matsuki dkk.⁴, pada gingiva penderita penyakit periodontal, sel makrofag merupakan sel yang merupakan sumber utama sintesis IL-1. Tokoro

dkk.² menyatakan bahwa mRNA IL-1 β merupakan sitokin proinflamasi predominan yang terdeteksi pada gingiva penderita periodontitis dan hal tersebut berkorelasi dengan meningkatnya jumlah infiltrasi sel makrofag dan sel T pada lesi.

Interleukin-1 β berperan penting dalam patogenesis penyakit periodontium dengan meningkatkan produksi matriks metalloproteinase, menstimulasi terbentuknya osteoklas dan resorpsi tulang serta menginduksi sintesis PGE₂ oleh sel makrofag.³ Salah satu karakteristik penting jaringan yang mengalami degradasi adalah tingginya konsentrasi IL-1, terutama IL-1 β . Pada jaringan sehat atau jaringan yang mengalami penyembuhan setelah mengalami perawatan, konsentrasi IL-1 β dan PGE₂ jauh lebih sedikit.¹³ Penggunaan obat-obat antiinflamasi yang mampu menghambat sintesis PGE₂ dan IL-1 β , untuk terapi penyakit periodontium, misalnya naproxen, terbukti efektif dalam menghambat destruksi jaringan periodontium.⁹

Penelitian terdahulu oleh Roberts dkk.¹⁴ diketahui bahwa terjadi peningkatan sintesis IL-1 β oleh sel makrofag kecil yang distimulasi dengan LPS *E.coli* bila dibandingkan dengan kelompok tanpa stimulasi LPS *E.coli*. Hasil dari penelitian ini diketahui bahwa minyak atsiri kencur mempunyai efek antiinflamasi dengan menyebabkan menurunnya sintesis IL-1 β oleh sel makrofag kecil yang distimulasi dengan LPS *E.coli*. Hal ini kemungkinan disebabkan karena zat aktif yang terkandung di dalam minyak atsiri kencur mempunyai kemampuan untuk mengganggu stabilitas protein permukaan membran sel makrofag sehingga mengganggu reseptor-reseptor yang terdapat pada permukaan sel makrofag.

Makrofag mengenali partikel target secara langsung melalui reseptor-reseptor permukaannya. Reseptor-reseptor permukaan pada makrofag mempunyai target yang spesifik terhadap produk-produk bakteri. Reseptor yang mengenali LPS bakteri yaitu CD14.^{14,15} Membrane glycerophosphatidylinositol-anchored CD14 molecule (mCD14) memperantarai ikatan LPS ke makrofag. Mekanisme interaksi antara LPS dengan makrofag ini melibatkan terbentuknya kompleks LPS-binding protein (LBP) yang berinteraksi dengan mCD14. LBP, dengan membentuk kompleks LPS yang berinteraksi dengan dengan mCD14, akan meningkatkan produksi sitokin¹⁶, termasuk sitokin-sitokin proinflamasi misalnya IL-1 α , IL-1 β , TNF- α

dan PGE₂.¹⁷

Apabila terjadi gangguan pada reseptor-reseptornya, maka makrofag tidak mampu mengenali LPS *E.coli*. Gangguan dalam pengenalan dan pengikatan LPS *E.coli* oleh reseptor-reseptor sel makrofag, akan berakibat penurunan aktivitas sel makrofag dalam memproduksi IL-1 β .

Kesimpulan dan Saran

Minyak atsiri kencur mempunyai kemampuan sebagai bahan antiinflamasi dengan menyebabkan penurunan sintesis IL-1 β sel makrofag kecil yang diinduksi dengan LPS *E.coli*.

Untuk pengembangan lebih lanjut, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui komponen utama dari minyak atsiri kencur yang berperan sebagai bahan antiinflamasi.

Daftar Acuan

1. Hillman GG, Haas GP. Role of Cytokines in Lymphocyte Functions. In: Aggarwal BB, Puri RK, (Editors). Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy. Cambridge: Blackwell Science. 1995:39
2. Tokoro Y, Yamamoto T, Hara K. IL-1 β mRNA as the Predominant Inflammatory Cytokine Transcript: Correlation with Inflammatory Cell Infiltration into Human Gingiva. *J Oral Pathol Med* 1996; 25:225-31
3. Czusak CA, Sutherland DE, Billman MA, Stein SH. Prostaglandin E₂ Potentiates Interleukin-1 Induced Interleukin-6 Production by Human Gingival Fibroblasts. *J Clin Periodontol* 1996; 23:635-640
4. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Interleukin-1 mRNA-Expressing Macrophages in Human Chronically Inflamed Gingival Tissues. *Am J Pathol* 1991; 138:1299-305
5. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, Chandra CS. Synthesis of Proinflammatory Cytokines by Human Gingival Fibroblast in Response to Lipopolisaccharides and Interleukin-1. *J Periodont Res* 1995; 30:382-89
6. Bergman M, Salma H, Bessler H, Omanski M, Punskey I, Djaldetti M. Interaction Between Phagocytosis and IL-1 Production by Rat Peritoneal Macrophage. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:1-4

7. Seymour GJ, Savage NW, Walsh LJ. Immunology an Introduction for the Health Sciences. Roseville: McGraw-Hill Book Co. 1995:76
8. Sipe JD, Bartle LM, Loose LD. Modification of Proinflammatory Cytokine Production by the Antirheumatic Agents Tenidap and Naproxen, A Possible Correlation with Clinical Acute Phase Response. *J Immunol* 1992; 148:480-84
9. William RC, Jeffcoat MK, Howell TH. Naproxen Treatment of Periodontitis in Beagles. *J Dent Res* 1989; 68: 243
10. Duke JA. *CRC-Handbook of Medicinal Herbs*. Florida: CRC-Press, 1985:259
11. Wahl LM, Corcoran ML. Regulation of Monocyte/Macrophage Metalloproteinase Production by Cytokines. *J Periodontol* 1993; 64:467-73
12. Tatakis DN. Interleukin-1 and Bone Metabolism: A Review. *J Periodontol* 1993; 64: 416-31
13. Page RC. The Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J Periodont Res* 1991; 26:230-42
14. Roberts FA, Richardson GJ, Michalek SM. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* Lipopolysaccharides on Mononuclear Phagocytes. *Infect Immun* 1997; 65:3248-254
15. Lowell C. Fundamentals of Blood Cell Biology. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editor. *Medical Immunology*. London: Prentice-Hall International Inc. 1997: 9-23
16. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2001
17. Camussi G, Mariano F, Biancone L, Martino AD, Bussolati B, Montrucchio G, Tobias PS. 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; 155:316-24
18. Muro M, Koseki T, Akifusa S, Kato S, Kowashi Y, Ohsaki Y, Yamato K, Nishijima M, Nishihara T. Role of CD14 Molecules in Internalization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by Macrophages and Subsequent Induction of Apoptosis. *Infect Immun* 1997; 65:1147-51