

PENGUJIAN EFEK IMUNOLOGIS SENYAWA p-METOKSI SINAMAT ETIL ESTER  
KENCUR (*KAEMPFERIA GALANGA* LINN) TERHADAP KEMAMPUAN  
FAGOSITOSIS SECARA *IN VITRO*  
(IMMUNOLOGIC EFFECT OF p-METOKSI CINAMAT ETHYL ESTER COMPOUND  
IN KENCUR (*KAEMPFERIA GALANGA* LINN) TO THE VIABILITY OF  
PHAGOCYTOSIS *IN VITRO*)

GUSTI REVILLA, ETI YERIZEL

ABSTRAK

Efek imunologis senyawa aktif p-metoksi sinamat etil ester yang terdapat di Kencur belum banyak diungkapkan. Untuk itu kami melakukan penelitian efek imunomodulasi senyawa aktif kencur terhadap kemampuan fagositosis secara *in vitro*. Fagositosis merupakan proses penelanan sampai penghancuran partikel asing yang masuk ke dalam tubuh. Proses ini dilakukan oleh fagosit polimorfonuklear (netrofil) dan fagosit mononuklear (makrofag).

Sel netrofil sebagai obyek eksperimen berasal dari orang sehat yang dipisahkan dari sel darah lainnya dengan menggunakan ficol. Netrofil dibagi atas 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan diberi senyawa p-metoksi sinamat etil ester, dibagi menjadi sub kelompok berdasarkan konsentrasi 100 ug/ml, 150 ug/ml dan 200 ug/ml. Kelompok kontrol mendapatkan perlakuan bahan pelarut yang dipakai untuk senyawa p-metoksi sinamat.

Melalui indeks fagositosis (IF) terhadap sel-sel ragi dapat dihitung angka persentase fagositosis (PF). Nilai PF sel netrofil yang mendapat perlakuan dengan konsentrasi 100 ug/ml sampai 200 ug/ml menurun dari - 9.75% sampai - 19.68%. Angka negatif dari nilai PF berarti senyawa p-metoksi sinamat etil ester mempunyai kemampuan immunosupresi yang bermakna terhadap fagositosis apabila kadarnya ditingkatkan ( $p=0.05$ ). Dengan hasil ini dapat dianjurkan untuk mengungkapkan dosis maksimal sifat supresan dari senyawa p-metoksi sinamat etil ester terhadap kemampuan fagositosis secara *in vitro*.

## ABSTRACT

Immunologic effect of p-metoksi cinamat ethyl ester found in *kencur* (*Kaempferia galanga* Linn) is not clear. We conducted in vitro research in immunomodulating effect of this compound on phagocytosis viability. Phagocytosis is the engulfing process and killing foreign particle. This process is carried by polymorphonuclear (neutrophils) and mononuclear (macrophage) phagocyte.

Neutrophils as experimental study was carried out to 5 samples from peripheral blood of healthy persons separated with ficoll from other blood cells. They are divided into two groups, experimental and control. Experimental group was treated with p-methoksi cinamat ethyl ester further divided into three subgroups with increasing concentration of 100 µg/ml, 150 µg/ml and 200 µg/ml respectively. Control group which treated with of the compound solvent p-methoksi cinamat ethyl ester.

Phagocytosis of neutrophils were observed after incubating the cells with yeast cells (*Saccharomyces cereviceae*) and the result were expressed as the phagocytosis index (PI). To evaluate the immunomodulatory effect of the compound the phagocytosis index was converted into phagocytosis percentage (PP). The PP of neutrophils treated p-metoksi cinamat with increasing concentration were - 9.75% of 100 µg/ml and - 19.68% for 200 µg/ml concentration respectively. The result showed that p-metoksi cinamat compound had immunosuppressive effect to the phagocytosis capability of neutrophil. The immunosuppressive effect increased significantly ( $p=0.05$ ) with increasing concentration. It is suggested that further research with maximal concentration immunosuppressive from p-metoksi cinamat ethyl ester to the phagocytic capability *in vitro*.

## 1. PENDAHULUAN

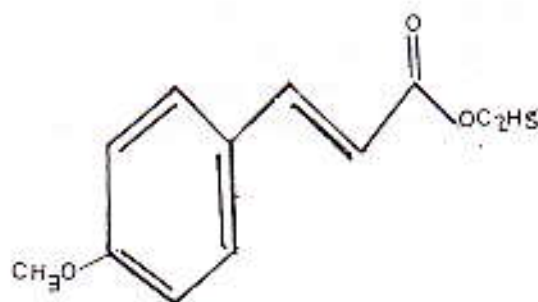
Penelitian efek imunologis suatu bahan alam terutama tanaman obat belum banyak diungkapkan. Bahan-bahan yang mempengaruhi kualitas dan intensitas sistem imunitas tubuh disebut imunomodulator. Bahan imunomodulator dapat berasal dari dalam tubuh/intrinsik seperti sitokin (Stites, dkk. 1994) dan dari luar tubuh/ekstrinsik diantaranya tanaman obat (Wagner, 1991).

Eksplorasi bahan imunomodulasi tanaman obat dapat dilakukan melalui dua pendekatan yaitu secara etnofarmakognosi dan kemotaksonomi. Pendekatan secara kemotaksonomi berarti mencari tanaman lain yang mengandung zat kandungan sejenis yang telah terbukti mempunyai efek pada sistem imunitas (Subowo, cit Labadie, 1994). Salah satu tanaman secara empirik telah diketahui sebagai obat dan mempunyai senyawa aktif turunan asam sinamat adalah kencur.

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn) telah dikenal masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional baik dalam bentuk tunggal maupun campuran. Sebagai obat kencur dipakai untuk mengobati penyakit diantaranya batuk, radang lambung, dan bengkak (Astuti, dkk. 1994), dan penyakit tersebut dapat dihubungkan dengan sistem imunitas tubuh.

Berbagai penelitian efek biologi kencur telah dilakukan yaitu sebagai antibakteri (Sugondo, dkk. 1986), antiradang (Sugiarso, dkk. 1994) dan penelitian efek imunomodulasi ekstrak air dan ekstrak metanol kencur (Gusti, dkk. 1996). Sebagai imunomodulasi diketahui bahwa ekstrak metanol kencur lebih besar menurunkan kemampuan fagositosis secara *in vitro* dibandingkan ekstrak air kencur. Dari penelitian juga diketahui pada ekstrak metanol kencur lebih banyak mengandung minyak atsiri dan flavonoid. Diantara minyak atsiri tersebut adalah zat aktif kencur yaitu p-metoksi sinamat etil ester.

Rumus bangun senyawa p-metoksi sinamat etil ester



Senyawa p-metoksi sinamat etil ester merupakan senyawa yang paling banyak jumlahnya diantara minyak atsiri lainnya. Penelitian efek biologi dari senyawa aktif ini yang telah dilakukan adalah sebagai pestisida (Roestan, dkk. 1996) Sedangkan penelitian lain belum diungkapkan, tetapi dari penelitian terhadap zat yang termasuk turunan asam sinamat telah dilakukan penelitian terhadap sistem imunitas tubuh. Dari penelitian diketahui bahwa senyawa turunan asam sinamat dapat menghambat jalur klasik dan jalur alternatif dari sistem komplemen. Senyawa yang dapat menghambat sistem komplemen dapat dipakai sebagai obat antiinflamasi. Sistem komplemen dapat mempengaruhi fagositosis yaitu sebagai opsonin dan kemotaksis (Wagner, 1990).

Fagositosis merupakan proses penelanan sampai penghancuran partikel asing oleh sel fagosit. Sel fagosit terdiri dari fagosit mononuklear (makrofag) dan fagosit polimorfonuklear (PMN/netrofil). Netrofil merupakan fagosit yang paling banyak ditemukan yaitu 60 - 70% dari total lekosit, sedangkan makrofag 3 - 8% (Junquiera, dkk. 1992).

Proses fagositosis ada beberapa tahap yaitu kemotaksis, penelanan, degranulasi dan penghancuran. Proses penelanan akan dipercepat dengan adanya opsonin berupa antibodi atau komplemen (C3b). Tiap tahap dari fagositosis ini dapat dilakukan uji kemampuannya secara *in vitro*, dan uji penelanan merupakan uji yang dapat diamati dengan cepat dan sederhana jika dibandingkan dengan uji tahap lainnya. Untuk uji penelanan yang tidak diikuti dengan penghancuran maka dipakai partikel yang sulit dihancurkan diantaranya adalah ragi (*Saccharomyces cereviceae*), karena ragi mempunyai dinding sel yang kaku terdiri dari selulosa dan netrofil tidak mempunyai enzim untuk menghancurkan dinding sel ragi ter- (Sheris, 1994).

Untuk menguji kemampuan penelanan dari netrofil maka sel tersebut harus dalam kondisi hidup, dan netrofil tersebut dipisahkan dari sel darah lainnya dengan menggunakan ficol. Darah diambil dari orang dewasa sehat, agar pengaruh imunomodulasi dari dalam tubuh dapat dihilangkan.

Kemampuan menelan netrofil diukur dengan menentukan nilai indeks fagositosis berdasarkan jumlah sel ragi yang tertelan dibagi dengan jumlah 100 sel netrofil yang diamati baik yang menelan maupun yang tidak menelan ragi. Untuk mengetahui apakah bahan yang diuji mempunyai pengaruh stimulasi atau supresi maka dilakukan penghitungan berdasarkan indeks fagositosis perlakuan dikurangi indeks fagositosis kontrol dibagi indeks fagositosis kontrol. Angka perolehan dari perhitungan dinyatakan dalam persentase (Wagner, 1990).

## II. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian bersifat eksperimental dengan rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan dan sub ulangan pengamatan 3 kali. Sebagai obyek penelitian adalah suspensi sel netrofil yang dipisahkan dari 5 orang dewasa sehat dan dibagi atas 2 kelompok yaitu:

1. Kelompok perlakuan yang diberi senyawa p-metoksi sinamat etil ester dengan konsentrasi bertingkat yaitu 100 ug/ml, 150 ug/ml dan 200 ug/ml.
2. Kelompok kontrol diberi perlakuan berdasarkan pelarut yang diberikan pada senyawa p-metoksi sinamat etil ester.

### 2.1 BAHAN PENELITIAN

#### a. Senyawa p-metoksi sinamat etil ester

Pemisahan senyawa p-metoksi sinamat etil ester adalah dengan cara maserasi dengan heksan, cairan yang didapatkan dikering dengan evaporator. Hasil evaporator didapatkan kristal dan fasa organik. Kristal yang didapatkan dilakukan kristalisasi dengan heksan didapatkan kristal jarum, kristal ini kemudian dilakukan pengukuran IR dan RMI nya, sehingga kristal jarum yang didapatkan ini benar-benar kristal dari senyawa p-metoksi sinamat. Untuk perlakuan senyawa p-metoksi sinamat etil ester dilarutkan dengan NaCl fisiologis ditambahkan DMSO. Kadar larutan senyawa yang dipakai untuk setiap perlakuan adalah 200 ul

#### b. Penyediaan Suspensi Netrofil

Darah diambil dari pembuluh vena sebanyak 15 ml dan dimasukkan kedalam tabung yang telah diberi heparin. Campuran itu kemudian diencerkan dengan dextran 1.5% T.500 sebanyak 7.5 ml dan didiamkan selama 30 menit. Suspensi yang berada diatas endapan eritrosit disedot dengan pipet dan dimasukkan kedalam tabung sentrifus yang telah berisi ficol sebanyak 5 ml. Tabung yang berisi suspensi dan ficol disentrifus selama 20 menit pada 3000 rpm. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet granulosit disuspensikan dengan RPMI dan disentrifus lagi selama 10 menit pada 1500 rpm untuk pencucian. Pelet granulosit dibuat suspensi dengan membubuhkan 2 ml RPMI kemudian dihitung. Suspensi netrofil dibuat agar kadarnya  $3.10^6$  sel/ml dan netrofil dalam kondisi hidup. Untuk masing-masing kelompok diperlukan sebanyak  $6.10^6$  sel granulosit yang disuspensikan dalam 200 u

#### c. Penyediaan Ragi

Ragi yang digunakan pada penelitian ini dibeli dari perusahaan Sigma. Ragi disuspensikan dengan NaCl fisiologis. Suspensi sel ragi dipanaskan dalam penangas air suhu 100 oC selama 30 menit. Setelah dingin suspensi disaring dengan kain kasa steril, filtrat yang dihasilkan dipanaskan lagi sampai sel ragi benar telah terpisah, perlakuan ini dapat dilakukan sampai 3kali, Filtrat sel ragi yang didapat-

kan diencerkan dengan NaCl fisiologis sampai mempunyai kadar  $3 \cdot 10^6$  sel/ml dan disimpan dalam suhu  $-20^\circ\text{C}$ . Untuk masing-masing sub kelompok perlakuan dan kontrol diperlukan sebanyak  $7 \cdot 10^6$  sel ragi dalam 200  $\mu\text{l}$  NaCl fisiologis.

#### d. Penyediaan Serum

Lima ml darah dimasukkan dalam tabung sentrifus dibiarkan beku, setelah itu disentrifus 5 menit pada 1500 rpm, sehingga serum dapat terpisah. Serum yang digunakan diencerkan dengan NaCl fisiologis dengan perbandingan 1 : 10.

## 2.2 CARA PERLAKUAN DAN PENGAMATAN

Untuk masing-masing kelompok suspensi granulosit, dibubuhkan ragi dan serum dalam volume yang sama (200 $\mu\text{l}$ ). Kedalam kelompok perlakuan campuran bahan di atas ditambahkan senyawa p-metoksi sinamat etil ester dalam konsentrasi yang berbeda dengan volume 200  $\mu\text{l}$ , sedangkan kelompok kontrol diberi zat pelarut saja. Campuran bahan-bahan tersebut diinkubasi selama 10 menit dalam penangas air dengan suhu  $37^\circ\text{C}$  sambil digoyang-goyang. Setelah diinkubasi ditetaskan pada 3 kaca sediaan, diratakan dan dikeringkan kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis. Setelah kering diwarnai dengan giemsa, setelah kering masing-masing sediaan dapat diamati dibawah mikroskop cahaya.

## 2.3 ANALISA DATA

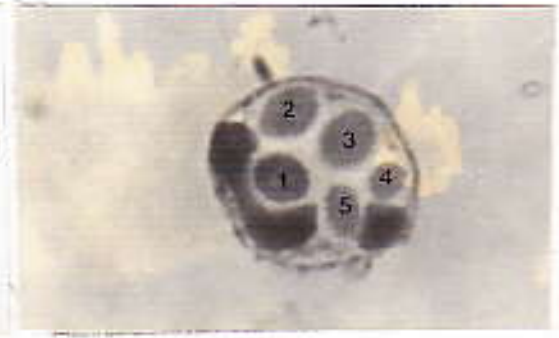
Untuk menentukan sifat imunomodulator senyawa p-metoksi sinamat etil ester kencur dapat dihitung dari nilai persentase fagositosis dan untuk membandingkan kekuatan imunomodulasi dari masing-masing konsentrasi yang diberikan dapat dilakukan analisa ragam dari nilai persentase fagositosis.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian kemampuan fagositosis netrofil dari 5 ulangan diperoleh bahwa kemampuan netrofil untuk menelan ragi dari setiap ulangan berbeda hal ini dapat dilihat pada tabel 1 (lampiran) juga dapat dilihat pada gambar 3.1 dan 3.2. Kemampuan yang berbeda ini mungkin disebabkan oleh kemampuan fagositosis netrofil setiap orang berbeda.



Gambar 3.1 Penampilan sel netrofil yang Mampu menelan ragi dan yang Tidak menelan ragi (400x)



Gambar 3.2 Sel netrofil dapat menelan sebanyak 5 sel (1000x)

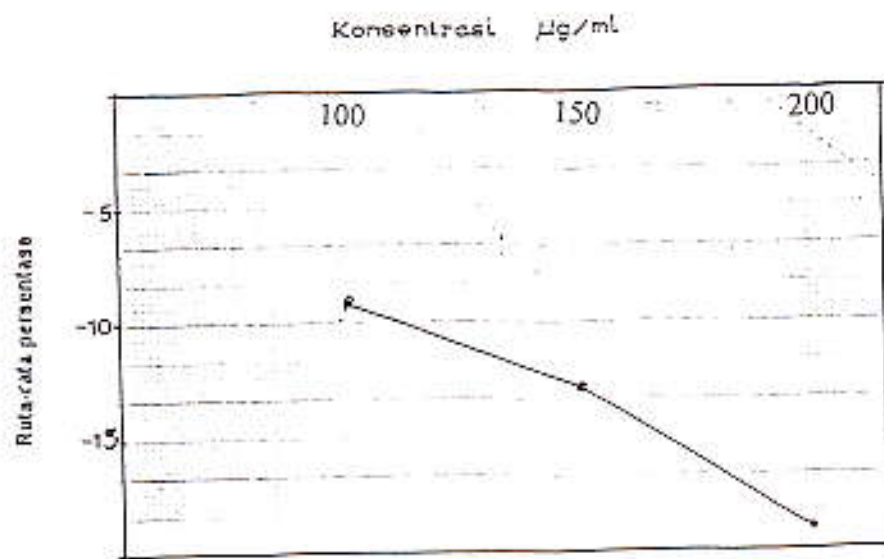
Tabel 4.1 Persentase fagositosis netrofil setelah diberi senyawa p-metoksi sinamat etil ester dengan berbagai konsentrasi pada 5 kali ulangan.

Ulangan	Persentase Fagositosis		
	Kons. 100 $\mu$ g/ml	Kons. 150 $\mu$ g/ml	Kons. 200 $\mu$ g/ml
1	- 10.85	- 9.32	- 12.71
2	5.85	2.76	- 29.83
3	- 30.09	- 15.24	- 32.04
4	- 6.50	- 45.83	- 6.07
5	- 5.13	- 29.92	- 22.22
Rata-rata	- 9.75	- 13.12	- 19.68

Dari kemampuan netrofil menelan ragi dapat diketahui sifat imunomodulasi dari suatu senyawa aktif suatu tanaman obat. Kemampuan senyawa p-metoksi sinamat etil ester terhadap fagositosis secara in vitro adalah dapat dilihat dari nilai persentase fagositosis (PF). Nilai PF setelah diberi senyawa p-metoksi sinamat etil ester dari berbagai konsentrasi dengan 5 ulangan dapat dilihat pada tabel 4.1. Nilai PF dari ke 5 ulangan ada satu ulangan pada konsentrasi 100 $\mu$ g/ml dan 150 $\mu$ g/ml yang menunjukkan angka positif, ini dapat diartikan bahwa senyawa p-metoksi sinamat bersifat stimulan. Angka positif ini disebabkan karena nilai indeks

toksi sinamat bersifat stimulan. Angka positif ini disebabkan karena nilai indeks fagositosis perlakuan lebih besar dari nilai indeks fagositosis kontrol dapat dilihat pada tabel 2 (lampiran), hal ini mungkin juga dapat menjelaskan bahwa kemampuan fagositosis netrofil setiap orang berbeda, tetapi secara rata-rata dari ke 5 ulangan nilai PFnya negatif.

Nilai negatif persentase fagositosis menunjukkan bahwa senyawa p-metoksi sinamat etil ester dapat menekan/mensupresi kemampuan fagositosis secara in vitro. Nilai PF dari konsentrasi 100 ug/ml sampai 200 ug/ml adalah - 9,75% sampai -19,68 %. Penurunan nilai PF bertambah besar sesuai dengan penambahan konsentrasi yang diberikan sehingga belum didapatkan konsentrasi maksimal penurunan kemampuan fagositosis secara in vitro dapat dilihat pada gambar 3. 3. Dari penurunan nilai PF dari masing-masing konsentrasi dilakukan analisis ragam, didapatkan penurunannya bermakna pada tingkat peluang 0.05.



Gambar 3.3 Kurva persentase penurunan fagositosis netrofil setelah diberi senyawa p-metoksi sinamat etil ester pada berbagai konsentrasi menunjukkan penurunan yang cukup jelas

Kemampuan supresi dari senyawa p-metoksi sinamat dapat diduga/dikaitkan dari hasil penelitian Wagner (1990), bahwa beberapa turunan asam sinamat dapat menghambat jalur klasik dan jalur alternatif dari sistem komplemen dan senyawa p-metoksi sinamat etil ester merupakan turunan dari asam sinamat. Sistem komplemen berperan dalam fagositosis yaitu dalam opsonin dan migrasi. Diduga senyawa p-metoksi sinamat dapat menghambat kemampuan migrasi sel netrofil, hal ini tentu perlu penelitian lebih lanjut efek dari senyawa ini terhadap migrasi sel netrofil. Juga



diduga senyawa ini dapat menghambat ikatan antigen yang telah diselubungi oleh opsonin komplemen dengan reseptor membran sel fagosit (Tamoto, dkk. 1994).

Kemampuan imunosupresi dari senyawa p-metoksi sinamat etil ester juga dapat dijelaskan dengan pemakaian obat imunosupresi diantaranya kortikosteroid yang akan mempengaruhi fungsi sel fagosit dalam bentuk penurunan fagositosis (penelanan dan migrasi) dan penekanan kemampuan mikrobisidal Meuleman, dkk. 1997).

Dari hasil penelitian diperoleh bahwa senyawa aktif kencur p-metoksi sinamat etil ester bersifat imunosupresi terhadap kemampuan fagositosis, ini dapat menjelaskan bahwa penggunaan kencur dimasyarakat untuk mengobati bengkak dan radang lambung dapat dipertahankan dan senyawa aktif ini mungkin cukup berperan dalam pengurangan bengkak ini.

## IV. KESIMPULAN DAN SARAN

### 4.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Senyawa p-metoksi sinamat etil ester kencur bersifat immunosupresi terhadap kemampuan fagositosis netrofil secara *in vitro* yang dilihat dari nilai persentase fagositosis.
2. Penurunan persentase fagositosis netrofil setelah diberi senyawa p-metoksi sinamat kencur bertambah dengan peningkatan konsentrasi yaitu dari - 9.75% sampai - 19.68%. Perbedaan penurunan nilai PF netrofil dan penggunaan konsentrasi menunjukkan perbedaan yang bermakna pada tingkat peluang 0.05.
3. Konsentrasi 200 ug/ml belum menghasilkan konsentrasi maksimal penurunan fagositosis, untuk itu dapat dilakukan penelitian lanjut dengan menggunakan konsentrasi yang lebih besar.
4. Penurunan kemampuan fagositosis netrofil setelah diberikan senyawa p-metoksi sinamat etil ester kencur mungkin menghambat migrasi sel netrofil atau dapat menghambat ikatan antara antigen (ragi) yang diselubungi oleh komplemen dengan reseptor membran sel.

### 4.2 SARAN

1. Untuk mendapatkan konsentrasi yang maksimal perlu dilakukan penelitian lanjutan pemberian konsentrasi yang lebih besar dari senyawa p-metoksi sinamat kencur terhadap kemampuan fagositosis secara *in vitro*.
2. Dari hasil penelitian ini dapat diperoleh dasar ilmiah pemakaian kencur di masyarakat untuk mengurangi bengkak dapat dipertahankan

## V. UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan telah terlaksananya penelitian ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Direktorat pembinaan penelitian dan pengabdian pada masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan dan Kebudayaan yang telah membiayai untuk terlaksananya penelitian ini
2. Staf dan karyawan labor Kimia Bahan Alam Jurusan Farmasi FMIPA Unand yang telah membantu dalam pemisahan kedua senyawa kencur.
3. Staf dan karyawan labor Biokimia dan labor Clinical Pathologi Fakultas Kedokteran yang telah memberikan fasilitas dan sarana penggunaan alat-alat selama kegiatan penelitian berjalan.
4. Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu telah membantu untuk kelancaran penelitian ini dari awal penelitian sampai penulisan laporan.

## VI. DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, Y. Sundari, D. Winarno, M.W. 1994. Tanaman kencur (*Kaempferia galanga* Linn) informasi efek farmakologi, fitokimia. Seminar Tanaman obat Indonesia (TOI) Bandung.
- Gusti, R., Subowo., Sidik., Yatin, W. Pengujian efek ekstrak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) terhadap imunomodulasi melalui uji fagositosis sel netrofil secara *in vitro*. Majalah Kedokteran Andalas (MKA), Vol. 20 No. 1 & 2 Januari - Juni 1996. Padang
- Meuleman, J. and Paul Katz. 1985. The imunologic, effects, kinetics and use glucocorticosteroids. Symposium on clinical immunology II. W.B Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo. Hal. 805 - 815.
- Roestan, M.R., Moelyono, M.W., Sidik. 1996. Penelusuran senyawa bioaktif larvasida rimpang *Kaempferia galanga* Linn terhadap larva *Aedes aegypti* Instar III. Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami VIII. Hal 408 - 410
- Subowo. 1994. Efek imunomodulator tanaman obat. Seminar tanaman obat Indonesia VI. Bandung.
- Sugiarso, N.C., Sutjiatmo, A.B. 1994. Uji antiradang rimpang kencur pada tikus galur Wistar. Seminar tanaman obat Indonesia VI. Bandung
- Sugondo, U. dkk. 1986. Efek antimikroba dari infusa *Kaempferia galanga*. Makalah dibacakan pada kongres Nasional IKAFI. Manado.
- Tamoto, K. Nochi, H. dkk. 1994. High molecular weight hyaluronic acids inhibit chemotaxis but not lysosomal enzyme release induced by receptor mediated stimulations in guinea pig phagocytes. *Journal Microbiology-Immunology* 38 (1) : 73 - 80
- Wagner, H. 1990. Search for plant derived natural products with immunostimulatory Activity (recent advances) *Pure& Appl Chemical*. Vol. 62 no 1 Hal 1217-1222
- Wagner, H., Jurcic, K. 1991. Assay for immunomodulation and effects on mediators of inflammation. *Methods inplant biochemistry*. Vol. 6. ISSN.