

PENGARUH EKSTRAK DIKLOROMETAN JAHE (*Zingiber officinale* Roscoe) TERHADAP PENGIKATAN TOKSIN KOLERA B-subunit CONJUGASI (FITC) PADA RECEPTOR SEL HIBRIDOMA LV DAN CACO-2

[Effect of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Dichloromethane Extract on Inhibition of Cholera Toxin B-subunit Conjugated FITC Binding to Receptor on LV Hybridome and Caco-2 Cells]

Radiati, L.E ¹⁾, Nabet, P, Franck, P ²⁾, Nabet B ²⁾, Capiaumont, J ²⁾., Fardiaz, D ³⁾. Zakaria, R.F ³⁾, I. Sudirman ⁴⁾, dan Hariyadi, R.D ³⁾

¹⁾ Program Studi teknologi Hasil Ternak, FAPET-Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang

²⁾ Laboratorium Biokimia Univ. Henri Poincare Nancy Perancis

³⁾ Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, FATETA- IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

⁴⁾ Kedokteran Hewan IPB, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680.

Diterima 25 Agustus 2002/Disetujui 25 April 2003

ABSTRACT

Cholera toxin is main factor that responsibility of watery diarrhea. The objectives of this investigation was to study the effect of ginger extract (GDE) in blocking cholera toxin binding to receptors of LV hybridome and Caco-2 cells.

Analysis of toxin binding by flow cytometry of 0-5 µg/ml of B-FITC conjugated cholera toxin to 10⁵ cells/ml of LV hybridome and Caco-2 cells in RPMI, at 4°C for one hour showed that specific interaction of B-FITC by 44,44 ± 3,49 percent to LV hybridome and by 94,58 ± 1,83 percent to Caco-2 cells

A total of 10⁵ cells/ml of hybridome and Caco-2 cells were incubated with 0-5 µg/ml toxin B-FITC and 25 or 50 µg/ml GDE in RPMI, at 4°C for one hour showed that the addition of GDE inhibited the toxin binding. The binding inhibition respectively were 4.76-15.66 and 12.55-24.60 percent to Caco-2 cells, and 3.55-17.95 and 3.58-27.83 percent to hybridome cells. The inhibition on the toxin binding may be due to modification of the receptor by GDE or interaction of GDE with the toxin.

Key words : Hibridoma LV, Caco2, ekstrak diklorometan jahe, and toksin kolera B-FITC

PENDAHULUAN

Salah satu manfaat jahe untuk kesehatan adalah sebagai ramuan obat tradisional, yang dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit termasuk gangguan pencernaan (Wijayakusuma, 1997), septisemia (Sohni et al., 1995), inflamasi kronis rematik artritis (Kimura et al., 1991), hepatitis kronis dan asma bronchitis (Watanabe et al., 1994). Pada percobaan *in vitro*, septisemia pada mencit dapat disembuhkan dengan *ayurvedic*, yaitu ramuan obat tradisional di India yang mengandung ekstrak jahe (Sohni et al., 1995). Pengobatan tradisional di Cina dan Jepang terhadap hepatitis kronis dan asma bronchitis dapat disembuhkan dengan *Syosaiko-to* yang juga merupakan obat tradisional mengandung jahe dan panax ginseng (Watanabe et al., 1994). Selain itu ekstrak jahe dapat meningkatkan daya tahan tubuh yang direfleksikan dalam sistem kekebalan, yaitu memberikan respon kekebalan inang terhadap mikroba patogen yang masuk kedalam tubuh. Hal itu disebabkan ekstrak jahe dapat memacu proliferasi limfosit

dan menekan limfosit yang mati (Zakaria et al., 1996), meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Zakaria dan Rajab, 1999), meningkatkan aktivitas sel NK dan proliferasi sel T secara *in vitro* (Tejasari, 2000). Menurut Nurrahman et al., (1999), mengkonsumsi sari jahe setiap hari dapat meningkatkan aktivitas sel T dan daya tahan limfosit terhadap stres oksidatif.

Manfaat jahe yang lain adalah sebagai pemberi citarasa dalam minuman tradisional, kembang gula dan sebagai bumbu dalam makanan (Fardiaz et al., 1992). Rasa jahe yang pedas disebabkan oleh komponen bioaktif oleoresin, sedangkan citarasa jahe disebabkan oleh kandungan minyak atsiri. Komponen bioaktif tersebut diketahui dapat berfungsi sebagai bahan pengawet yang tidak toksik, dan dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroba namun tergantung dari dosisnya (Mishra dan Dharendra, 1990; Nychas, 1995; Neinaber et al., 1997 dan Hiserodt et al., 1998, Radiati, 2002).

Peranan ekstrak jahe dalam minuman fungsional dan obat tradisional (Wijayakusuma, 1997) dapat meningkatkan ketahanan tubuh dan mengobati diare.

Kasus kejadian diare di negara berkembang menunjukkan 70 persen dari penyakit diare disebabkan oleh konsumsi makanan yang tercemar bakteri. Dari kasus diare tersebut resiko kematian yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* mencapai 0,001-0,010 persen per bulan (Calderwood, 2000).

Toksin kolera merupakan salah satu faktor virulensi dari *V. cholerae* O1 yang bertanggungjawab terhadap terjadinya diare. Toksin terdiri atas subunit A (toksin-A) yang bersifat toksik dikelilingi oleh lima molekul subunit B (toksin-B) yang berfungsi sebagai sisi toksin yang menempel pada reseptor dari permukaan sel inang (Holmgren, 1978).

Penempelan toksin-B (ligan) pada reseptor terjadi karena adanya interaksi dari molekul yang mempunyai struktur yang cocok (Duncan-Hewitt, 1990), interaksi ini distabilkan oleh ikatan: (1) elektrostatik antara sisi yang mempunyai muatan ionik berlawanan, seperti rantai asam amino yang mempunyai gugus samping NH_3^+ dari lisin dengan gugus $-\text{COO}^-$ dari asam amino glutamat. (2) Ikatan hidrogen adalah ikatan yang dibentuk antara gugus hidrofil molekul, dan (3) ikatan hidrofobik yaitu ikatan yang dibentuk oleh gugus non polar molekul.

Penggunaan sel Caco-2 sebagai model sel untuk penelitian tentang pengikatan toksin kolera pada reseptor memenuhi kriteria sebagai sel epitel, karena merupakan turunan alur adenokarsinoma kolon manusia dan mempunyai reseptor spesifik terhadap toksin kolera. Secara *in vitro* sel tersebut tumbuh sebagai monolayer, yang mempunyai morfologi dan fungsi diferensiasi serta karakteristik enterosit (Crociani et al., 1995). Analisis pengikatan toksin kolera pada sel Caco-2 dapat dilakukan dengan metoda *flow cytometry* dan mikroskopis, melalui suatu pelabelan pada toksin dengan menggunakan senyawa berfluoresens. Adanya perubahan intensitas fluoresens yang terukur dapat menunjukkan adanya perubahan ikatan toksin dengan sel Caco-2.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak diklorometan jahe terhadap pengikatan toksin kolera-B terkonjugasi-FITC (*fluoresence isothiocyanat*) (B-FITC) pada sel hibridoma dan Caco-2.

METODOLOGI

Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah sel hibridoma dan enterosit Caco-2 yang diperoleh dalam keadaan beku dari Laboratorium Biokimia, Universitas Henri Poincare Nancy Perancis. Media RPMI (Roosevelt Park Medical Institute) 1640 yang mengandung 4 mM L-glutamin dan pH fenol merah (Boehringer, M12-702,

Mannheim, German) dan serum anak sapi (Jacques Boy, Reims, France).

Peralatan yang digunakan antara lain: Inkubator CO_2 (Jouan E.G. 115 IR), sentrifus (Jouan CR. 3000), *laminar flow* (Glass 100 GELAIR) dan EPICS XL *flow cytometry* (Coultronics Margency, France) dan mikroskop (Diaphon-NIKON).

Ekstrak diklorometan jahe

Sebanyak 10 g bubuk jahe diekstrak dua kali masing-masing dengan 100 ml heksan, residu diekstrak dua kali masing-masing dengan 100 ml diklorometan dan residu kedua diekstraksi dua kali masing-masing dengan 100 ml etanol. Proses ekstraksi dilakukan secara maserasi pada suhu ruang, dengan kecepatan rotasi 150 rpm selama 6 jam. Tiap-tiap filtrat dipisahkan dari pelarut dengan cara penguapan dalam rotavapor.

Ekstrak diklorometan jahe, yang telah dihilangkan residu pelarutnya dengan gas nitrogen, dilarutkan dalam DMSO, yang kemudian diencerkan dengan PBS sehingga diperoleh konsentrasi akhir 4 mg/ml ekstrak jahe dengan 0,75 persen DMSO dalam bufer PBS.

Toksin kolera subunit B terkonjugasi-FITC

Toksin kolera subunit B-terkonjugasi-FITC (*fluoresence isothiocyanat*) (B-FITC) dan toksin kolera subunit B tanpa konjugasi (Sigma). Sebanyak 0,5 mg protein toksin dilarutkan dalam 2,5 ml PBS, sehingga didapat konsentrasi akhir 200 $\mu\text{g/ml}$.

Kultur sel hibridoma LV dan Caco-2

Sel hibridoma LV merupakan turunan hibridomaa HPL (Human plasenta). Sel hibridoma LV dan Caco-2 ditumbuhkan dalam tabung kultur 50 cm^2 (Plastik Nunclon-Delta) yang berisi media RPMI 1640 yang mengandung 4 mM L-glutamin, dengan indikator pH fenol merah dan 10 persen serum anak sapi. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C , 5 persen CO_2 , 95 persen udara dengan kelembaban 99 persen. Media kultur diganti setiap dua hari. Sel pada fase pertumbuhan ekponensial dengan densitas minimum 10^6 sel/ml digunakan sebagai sample. Sel Caco-2 digunakan setelah tripsinasi dengan 1,25 persen tripsin pada 37°C selama 5 menit.

Cara menghitung viabilitas sel yaitu mengambil 100 μl kultur ditambah 100 μl tripan biru, lalu diteteskan pada hemasitometer. Sel hidup memberikan penampakan yang bersinar dan yang mati berwarna biru. Setiap kotak besar dari hemasitometer mempunyai volume 10^{-4} ml, sehingga jumlah sel terhitung dikalikan dengan faktor pengenceran 10^4 sel/ml. Pengamatan ini dilakukan 3 kali ulangan.

Penambahan ekstrak jahe pada kultur sel

Kurva pertumbuhan hibridoma LV atau Caco-2 diperoleh dari menginkubasi sel 10^5 sel/ml dengan berbagai konsentrasi 12,5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak diklorometan jahe dalam tabung kultur 50 cm^2 (Plastik Nunclon-Delta) yang mengandung 9 ml RPMI 1640. Pengamatan setiap hari terhadap proliferasi sel dilakukan dengan penambahan tripan biru pada sampel sel dan penghitungan menggunakan hemasitometer. Selanjutnya kultur diinkubasi hingga 4 hari.

Aplikasi flow Cytometry untuk menentukan viabilitas sel

Viabilitas sel ditentukan berdasarkan morfologi dengan metoda *flow cytometry*. Alat yang digunakan adalah EPICS-XL *flow cytometer* yang dilengkapi dengan laser argon dengan eksitasi pada λ 488 nm. Sel hidup pada umumnya mempunyai volume yang penuh dan membran plasma tidak berglanular. Jika sel mulai mati maka bentuk sel mulai menyempit dan membran plasma bergranular. Aspek morfologi sel yang dapat dideteksi dengan *flow cytometry* adalah sinar yang mengenai sel hidup, permukaan sel hidup dapat mendifraksi sinar dengan sudut sinar yang kecil (FLS: *Forward light Scatter*) sedangkan sel yang mati dengan struktur membran sel bergranula merefraksi sinar sampai 90° (90LS: *light Scatter*). Hasil analisis dengan *flow cytometry* dapat dilihat pada sitogram FLS x 90LS yang menunjukkan dua populasi yang berbeda, satu populasi sel hidup dan kedua populasi sel mati (Gambar 1). Dimana yang terukur adalah log intensitas sinar difraksi (LFLS) dengan log intensitas sinar refraksi (L90LS) (Al-Rubeai dan Emery, 1996).

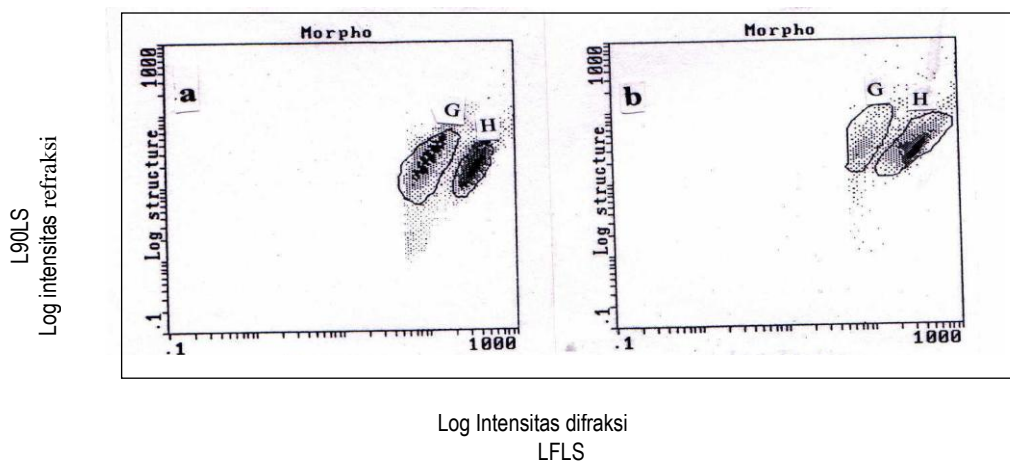
Analisis ikatan toksin B-FITC pada reseptor dengan Flow Cytometry

Penggunaan FITC sebagai label pada toksin-B, memungkinkan adanya ikatan toksin B-FITC dengan sel hibridoma LV dan Caco-2 dapat dideteksi dengan metoda *flow cytometry*. Isotiosianat mempunyai emisi fluoresens hijau λ 543 nm, pada histogram monometrik (1024 skala logaritma), yang diekspresikan sebagai nilai tengah intensitas fluoresens (MIF: *mean intensity of fluorescence*; $MIF = e^{(\ln 1000/1024) x}$), dimana x adalah nilai tengah puncak logaritma (Gambar 2).

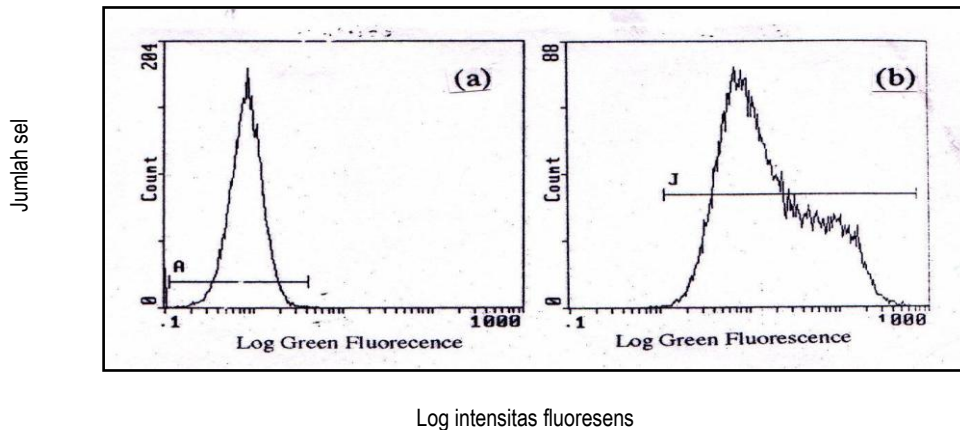
Penjenuhan dan ikatan spesifik toksin B-FITC pada sel hibridoma LV dan Caco-2

Kurva ikatan toksin B-FITC diperoleh dengan menginkubasi 10^5 sel/ml hibridoma LV dan Caco-2 dengan berbagai konsentrasi 0,00, 0,01, 0,10, 0,50 dan 5,00 $\mu\text{g/ml}$ toksin B-FITC dalam media RPMI pada suhu 4°C selama 1 jam. Nilai tengah fluoresens tiap konsentrasi toksin subunit B-FITC adalah ikatan total toksin B-FITC pada hibridoma atau Caco-2 (Al-Rubeai dan Emery, 1993).

Ikatan non spesifik diperoleh dari menginkubasi 10^5 sel/ml hibridoma LV dan Caco-2 pada konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$ toksin B tanpa-FITC dengan masing-masing konsentrasi 0, 0,05, 0,10, 0,50, 1,00 dan 5,00 $\mu\text{g/ml}$ toksin-FITC dalam suspensi sel. Kultur diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 jam, kemudian kultur disentrifus 300 g, pada 4°C selama 5 menit dan pelet sel dicuci dua kali dengan 1 ml PBS. Selanjutnya pelet sel diresuspensikan dalam 1 ml PBS dan segera dianalisis pada *flow cytometry*.



Gambar 1. Sitogram *flow cytometry*: Log intensitas sinar difraksi (LFLS) meningkat menunjukkan populasi sel hidup (H) dan log intensitas sinar refraksi (90LS) meningkat dengan LFLS menurun menunjukkan populasi sel mati (G);. Populasi (a) sel hibridoma dan (b) sel Caco-2.



Gambar 2. Histogram fluoresens dari toksin B-FITC; (a) populasi sel tanpa toksin B-FITC, tidak berfluoresens, (b) populasi sel berfluoresens dengan toksin B-FITC yang terikat pada reseptor, penambahan 40 µg/ml toksin-FITC pada 10⁶ sel/ml sel hibridoma LV

Ikatan spesifik adalah terikatnya toksin pada spesifik reseptor yang terdapat pada membran sel hibridoma LV maupun pada Caco-2. Karakteristik spesifik antara lain adalah mempunyai afinitas tinggi terhadap reseptor dan pada konsentrasi yang sedikit akan memberikan respon fluoresens. Ikatan ini dapat ditentukan dengan metoda inkubasi kompetitif antara toksin B-FITC pada konsentrasi yang terbatas dengan toksin-B tanpa-FITC pada konsentrasi yang berlebih. Penambahan secara bersamaan antara toksin tersebut akan memberikan fluoresens pada kultur, dimana nilai fluoresens ini dikategorikan sebagai ikatan non spesifik toksin B-FITC pada hibridoma LV dan Caco-2. Dengan demikian nilai persen ikatan spesifik toksin B-FITC merupakan selisih dari total ikatan dengan ikatan non spesifik dibagi total ikatan dikalikan 100 persen. Inkubasi kultur dilakukan pada suhu 4°C untuk menghindari terjadinya internalisasi toksin B-FITC pada sel hibridoma LV dan Caco-2 karena pengaruh suhu.

Analisis penghambatan ekstrak diklorometan jahe terhadap pengikatan toksin B-FITC pada sel hibridoma LV dan Caco-2

Sebanyak 10⁵ sel/ml hibridoma dan Caco-2 ditambah 25 dan 50 µg/ml ekstrak diklorometan jahe dan berbagai konsentrasi 0, 0,01, 0,05, 0,10, 0,50 dan 5,00 µg/ml toksin B-FITC (konsentrasi akhir) dalam media RPMI 1640. Kultur diinkubasi pada 4°C selama 1 jam. Selanjutnya kultur disentrifus pada 300 g, 4°C selama 5 menit dan pelet sel dicuci dua kali dengan 1ml PBS, kemudian pelet sel diresuspensikan dalam 1 ml PBS dan segera dianalisis pada *flow cytometry*.

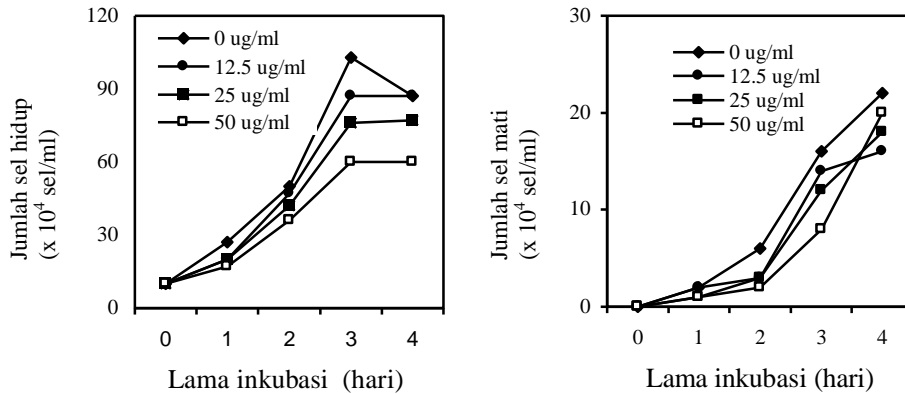
Penghambatan ekstrak jahe terhadap pengikatan toksin B-FITC pada sel hibridoma LV dan Caco-2 ditentukan berdasarkan penurunan intensitas fluoresens sel tersebut. % penghambatan : $\{MIF_{(toksin-B-FITC)} - MIF_{(toksin-B-FITC + jahe)}\} / MIF_{(toksin-B-FITC)} \times 100 \%$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

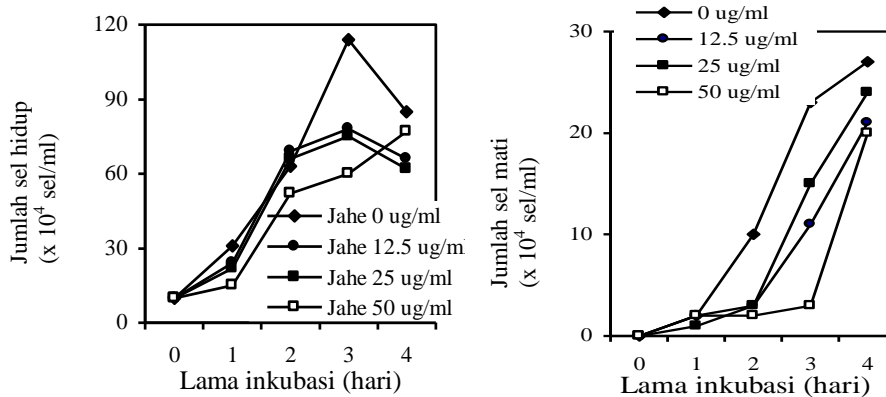
Pengaruh ekstrak diklorometan jahe terhadap pertumbuhan sel hibridoma LV dan Caco-2

Kultur hibridoma LV dan Caco-2 yang ditumbuhkan pada media RPMI, 10 persen FCS, yang mengandung 12,5, 25 dan 50 µg/ml ekstrak diklorometan jahe. Pertumbuhan kultur ini selama 4 hari dapat dilihat pada Gambar 3-4. Pada umumnya kurva pertumbuhan terdiri atas 4 fase yaitu fase adaptasi pada hari ke 0-1, proliferasi eksponensial pada hari ke 1-3, stasioner dan penurunan pada hari ke 4. Penambahan ekstrak diklorometan jahe menyebabkan penurunan pertumbuhan kedua jenis sel dibanding kontrol tetapi dapat menekan jumlah sel yang mati.

Hasil pengamatan ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Surh (1999) bahwa ekstrak jahe terutama gingerol mempunyai pengaruh antiproliferasi pada sel HL-60. Hal ini disebabkan gingerol dapat menghambat penyerapan Ca⁺⁺ pada kondisi fosforilasi mikrosom. Data tersebut dapat menduga bahwa gingerol menghambat penyerapan Ca⁺⁺ pada fase pertumbuhan, tetapi pada kondisi tidak fosforilasi dapat meningkatkan penyerapan Ca⁺⁺.



Gambar 3. Pertumbuhan 10^5 sel/ml Caco-2 pada media RPMI 1640, yang mengandung 12,5, 25 dan 50 µg/ml ekstrak diklorometan jahe.



Gambar 4. Pertumbuhan 10^5 sel/ml hibridoma pada media RPMI 1640 yang mengandung 12,5, 25 dan µg/ml ekstrak diklorometan jahe.

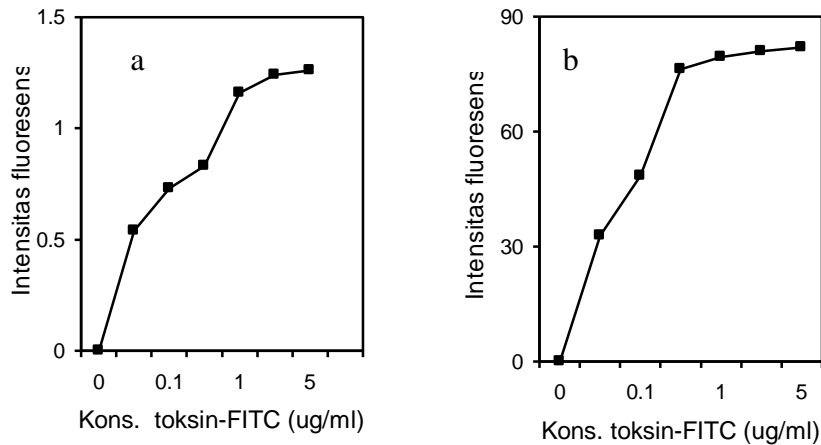
Sehingga pada fase pertumbuhan tetap (stasioner) gingerol mempunyai aktivitas mempertahankan keseimbangan Ca^{++} dan dapat menekan sel yang mati (Antipenko et al., 1999).

Dijelaskan lebih lanjut bahwa Ca^{++} mempunyai peranan penting dalam pengaturan intraseluler dan mempunyai fungsi sebagai pembawa pesan kedua untuk molekul ekstraseluler. Hal ini di tunjukkan bahwa penyuntikan intraseluler dengan sejumlah kecil Ca^{++} dapat mengakibatkan sel otot berkontraksi, sehingga dapat dikatakan bahwa gingerol dapat mempertahankan keseimbangan penyerapan dan pengeluaran Ca^{++} pada plasma membran tanpa fosforilasi.

Reseptor kolera toksin B-FITC pada hibridoma LV dan Caco-2

Analisis terhadap populasi sel hidup dan mati dengan *flow cytometry* (Gambar 2) memungkinkan untuk melihat pengikatan toksin B-FITC pada populasi sel yang

hidup saja. Kriteria terjadinya ikatan antara toksin B-FITC pada reseptor permukaan sel hibridoma LV dan Caco-2 dengan metoda *flow cytometry* berdasarkan pada peningkatan intensitas fluoresens permukaan sel. Gambar 5 menunjukkan kejenuhan reseptor toksin pada hibridoma LV dan Caco-2. Peningkatan konsentrasi 0-5 µg/ml toksin B-FITC pada kultur sel hibridoma LV dan Caco-2 meningkatkan intensitas fluoresens, yang menunjukkan bahwa kedua jenis sel ini mempunyai reseptor toksin kolera. Kejenuhan toksin B-FITC pada hibridoma LV kemungkinan terjadi pada konsentrasi 0,5-1 µg/ml toksin B-FITC, dan peningkatan intensitas fluoresens pada penambahan 1-5 µg/ml toksin B-FITC kemungkinan karena adanya ikatan yang tidak spesifik dari toksin B-FITC pada hibridoma LV (Gambar 5a). Konsentrasi 1-5 µg/ml toksin B-FITC terlihat dapat menjenuhi semua pada sel Caco-2 (Gambar 5b).



Gambar 5. Kurva penenuhan reseptor oleh toksin B-FITC pada sel hibridoma LV (a) dan Caco-2 (b)

Reseptor spesifik toksin B-FITC pada hibridoma LV dan Caco-2

Analisis ikatan spesifik toksin B-FITC pada reseptor hibridoma LV dan Caco-2 dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2. Penambahan konsentrasi toksin B-tanpa FITC secara berlebihan pada analisis ikatan spesifik toksin-reseptor bertujuan untuk memblok keseluruhan reseptor pada permukaan membran sel hibridoma LV dan Caco-2, sehingga fluoresens yang dihasilkan merupakan fluoresens dari toksin B-FITC yang terikat secara tidak spesifik. Penambahan toksin B-FITC pada berbagai konsentrasi 0-5 µg/ml terhadap hibridoma LV dan Caco-2, yang diasumsikan sebagai total ikatan menghasilkan intensitas fluoeresens yang lebih tinggi pada Caco-2 daripada hibridoma LV, ini berarti jumlah reseptor toksin B-FITC lebih banyak pada Caco-2, dengan stereospesifik (kespesifikan) ikatan toksin B-FITC pada Caco-2 sebesar $94,58 \pm 1,83$ persen dan pada hibridoma LV sebesar $44,62 \pm 3,49$ persen.

Pengaruh ekstrak diklorometan jahe terhadap pengikatan toksin B-FITC pada sel hibridoma LV dan Caco-2

Pengaruh 25 dan 50 µg/ml ekstrak diklorometan jahe terhadap pengikatan 0-5 µg/ml toksin B-FITC pada 10^5 sel hibridoma LV dan Caco-2 dalam 1 ml RPMI disajikan pada Gambar 6 dan 7. Ekstrak diklorometan jahe dalam kultur hibridoma LV dan Caco-2 dapat menurunkan terikatnya toksin B-FITC (Gambar 6a dan 7a) dengan persentase penghambatan dapat dilihat pada Gambar 6b dan 7b. Nilai penghambatan dari 25 dan 50 µg/ml ekstrak diklorometan jahe pada hibridoma LV berturut-turut 4,76-15,66 persen dan 12,96-24,68 persen. Penghambatan 25 dan 50 µg/ml ekstrak diklorometan jahe pada sel Caco-2 berturut-turut 3,55-17,95 persen dan 4,39-15,95 persen.

Tabel 1. Total ikatan, ikatan non spesifik dan spesifik dari toksin B-FITC pada 10^5 sel/ml hibridoma LV, pada konsentrasi 40 ug/ml toksin B-tanpa-FITC dengan berbagai konsentrasi toksin B-FITC

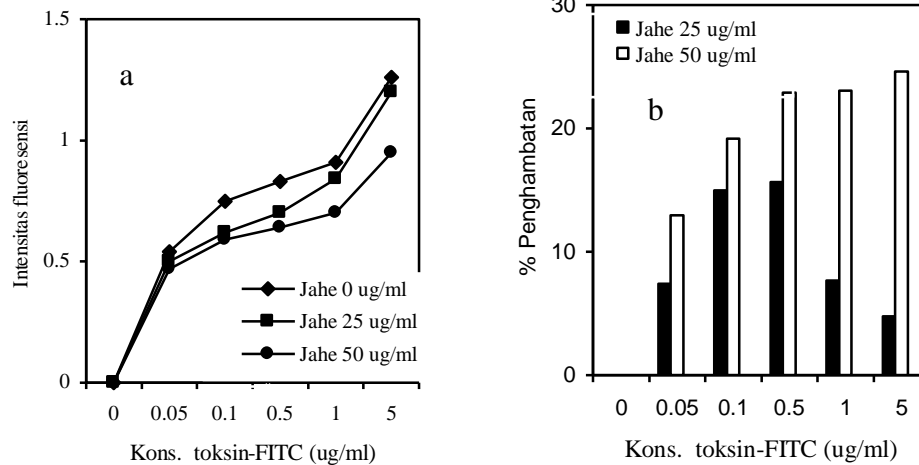
Toksine-FITC (ug/ml)	Nilai tengah intensitas fluoeresens			
	Ikatan total	Ikatan non spesifik	Ikatan spesifik	% ikatan spesifik
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,05	0,54	0,30	0,24	44,44
0,10	0,73	0,40	0,33	45,20
0,50	0,83	0,42	0,41	49,97
1,00	0,91	0,51	0,40	43,00
5,00	1,26	0,75	0,51	40,47

Tabel 2. Total ikatan, ikatan non spesifik dan spesifik toksin B-FITC pada 10^5 sel/ml Caco-2, pada konsentrasi 40 ug/ml toksin B tanpa-FITC dengan berbagai konsentrasi toksin B-FITC

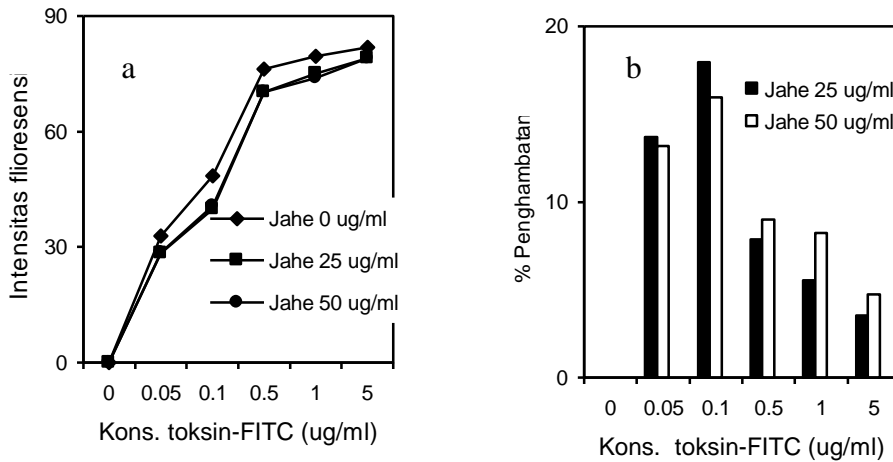
Toksine-FITC (ug/ml)	Nilai tengah intensitas fluoresens			
	Ikatan total	Ikatan non spesifik	Ikatan spesifik	% ikatan spesifik
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,05	32,91	1,93	30,98	94,13
0,10	48,51	1,92	46,58	96,02
0,50	76,21	3,07	73,14	95,97
1,00	79,51	3,84	75,67	95,17
5,00	81,91	6,87	75,04	91,61

Penghambatan ekstrak diklorometan jahe terhadap ikatan toksin B-FITC pada hibridoma LV dan Caco-2, mungkin disebabkan karena ekstrak jahe memodifikasi reseptor toksin. Menurut (Nychas, 1995) senyawa fenolik dan minyak atsiri dapat berinteraksi dengan fosfolipid, protein dan oligosakarida yang merupakan komponen membran sel. Komponen yang terdapat dalam ekstrak diklorometan jahe seperti gingerol, shogaol, zingeron dan minyak atsiri dapat berinteraksi dengan GM_1 yang merupakan reseptor pada permukaan sel (Gill, 1978), sehingga toksin-FITC tidak dapat berinteraksi dengan sel. Penggunaan 50 μ g/ml ekstrak diklorometan jahe dalam

suspensi 10^5 sel/ml belum cukup untuk menghambat keseluruhan toksin B-FITC, yang berarti konsentrasi ini tidak cukup untuk menjenuhi reseptor. Penggunaan ekstrak jahe dengan konsentrasi diatas 50 μ g/ml tidak dilakukan karena penggunaan ekstrak jahe pada penelitian ini dibatasi pada konsentrasi minimal yang mempengaruhi penurunan proliferasi sel hibridoma LV dan Caco-2. Oleh karena itu penggunaan konsentrasi diklorometan jahe pada analisis pengikatan toksin B-FITC menggunakan batas konsentrasi tersebut.



Gambar 6. Pengaruh ekstrak diklorometan jahe 25 dan 50 μ g/ml terhadap ikatan toksin B-FITC pada sel hibridoma LV 10^5 sel/ml; (a) intensitas fluoresens dan (b) persen penghambatan intensitas fluoresens.



Gambar 7. Pengaruh ekstrak diklorometan jahe 25 dan 50 µg/ml terhadap ikatan toksin-FITC pada 10⁵ sel/ml Caco-2; (a) intensitas fluoresens dan (b) persen penghambatan intensitas fluoresens.

Penghambatan ikatan toksin B-FITC pada sel hibridoma LV dan Caco-2 kemungkinan disebabkan oleh interaksi senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak jahe dengan protein toksin, sehingga toksin B-FITC tersebut tidak dapat mengenali reseptornya. Senyawa fenolik tidak hanya berinteraksi dengan reseptor toksin B-FITC pada hibridoma LV dan Caco-2, tetapi dapat berinteraksi dengan komponen lain, seperti fosfolipid, protein dan lipoprotein. Sedangkan kolera toksin lebih spesifik pada gangliosida GM₁, sehingga peluang komponen jahe untuk dapat berikatan dengan gangliosida GM₁ lebih rendah dibandingkan GM₁ dengan toksin B-FITC.

Menurut Gill (1978) reseptor toksin pada sel eukariot lebih banyak pada sel usus kecil daripada sel limfosit, sehingga turunannya akan membawa sifat sel primer. Caco-2 yang merupakan turunan sel enterosit mempunyai reseptor toksin kolera lebih banyak dan spesifik daripada hibridoma LV, sehingga penghambatan terhadap ikatan toksin pada reseptor cenderung lebih rendah pada Caco-2 daripada hibridoma LV.

KESIMPULAN

Ekstrak diklorometan jahe dapat menghambat pengikatan toksin B-FITC pada reseptor yang terdapat pada permukaan sel hibridoma LV dan Caco-2. Penggunaan 25 dan 50 µg/ml ekstrak diklorometan jahe pada kultur sel hibridoma LV berturut-turut menunjukkan penghambatan pengikatan toksin B-FITC sebesar 4,76-15,66 persen dan 12,96-24,60 persen, sedangkan pada

sel Caco-2 menunjukkan penghambatan pengikatan toksin B-FITC sebesar 3,55-17,95 persen dan 3,58-27,83 persen.

Ini berarti ekstrak diklorometan jahe menghambat faktor virulensi bakteri melalui kemungkinan mekanisme interaksi komponen ekstrak jahe dengan reseptor atau interaksi dengan toksin B-FITC.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada DIKTI (Proyek URGE) dan Pemerintah Perancis yang telah mendanai penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Rubeai, M. and A.N. Emery. 1996.** Flow cytometry applications in cell culture. Marcel Dekker, Inc. Hongkong.
- Antipenko, A.Y, A.I. Spielman and M.A. Kirchberge. 1999.** Interaction of 6-gingerol and ellagic acid with the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca⁺⁺ ATPase. J. Pharmacol Exp. Ther. 290 (1): 227-234.
- Calderwood, E.T. 2000.** Cholera vaccines. J. Clin. Infect. Dis. 31 (2): 561-565
- Crociani, J., J.P. Grill, M. Humpert and J. Ballongus. 1995.** Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cell and comparison with in vivo study. J. Letters In Appl. Microbiol. 21: 146-148.

- Duncan-Hewitt, W.C. 1990.** Natural of the hydrophobic effect. In Doyle RJ and M. Rosenberg. Eds. Microbial Cell Surface Hydrophobicity. American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- Fardiaz, D., S. Fardiaz dan C.H. Wijaya. 1992.** Antioxidant and antimicrobial activity of food flavorings. Proceedings of Symposium on Flavour Technology and Its Application in the Food Industry. November 26, 1992. Jakarta.
- Hiserodt, R.D., S.G. Franzblau and R.T. Rosen. 1998.** Isolation of 6-, 8- and 10-gingerol from ginger rhizome by HPLC and preliminary evaluation of inhibition of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. J. Agric. Food Chem. 46: 2504-2508.
- Holmgren, J. 1978.** Cholera toxin and the cell membrane. In Jeljaszewicz, J. and T. Wadstrom. Eds. Bacterial Toxins And Cell Membranes. Academic Press. New york.
- Kimura M., L. Kimura, B. Luo and S. Kobayashi. 1991.** Antiinflammatory effect of Japanese-Seno medicine Keishi-Kajutsu-to and its component drugs on adjuvant air pouch granuloma of mice. J. Phytotherapy-Res. 5 (5): 195-200.
- Mishra, D. and M. Dhirendra. 1990.** Seed protectant property of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe. J. Indian Perfumer. 34 (4): 266-268.
- Neinaber, N.L.P., W.P. Rahayu dan N. Andarwulan. 1997.** Sifat antioksidan dan antimikroba rempah-rempah dan bumbu tradisional Makalah Seminar Khasiat dan Keamanan Rempah, Bumbu dan Jamu Tradisional. PKMT, PAU Pangan dan Gizi dan LPM. IPB. Bogor.
- Nurrahman, F.R. Zakaria, D. Sajuthi dan Sanjaya. 1999.** Pengaruh konsumsi sari jahe terhadap perlindungan limfosit dari stres oksidatif pada mahasiswa pondok pesantren Ulil Al Baab. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan. 707-716.
- Nychas, G.J.E. 1995.** Natural antimicrobials from plants. In Gould GW. Ed. New Methods of Food Preservation. Blackie Academic and Profesional. London.
- Radiati, E.L. 2002.** Mekanisme Penghambatan Virulensi Bakteri Enteropatogen oleh Ekstrak Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Roscoe). Disertasi IPB. Bogor
- Sohni, Y.R., Padmaja-Kaimal, R.M. Bhatt and P. Kaimal. 1995.** Prophylactic therapy of *Salmonella typhi* septicemia in mice with a traditionally prescribed crude drug formulation. J. Ethnopharmacol. 45 (2): 141-147.
- Surh, Y.J., E. Lee. and J.M. Lee. 1998.** Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. J. Mutat. Res. 402 (1-2): 259-257.
- Watanabe, K., N. Tamaru, H. Takihara and M. Yosida. 1994.** Syosaiko-to and Saibuku-to (Chinese-Japanese herbal medicine) suppress the release of arachidonic acid metabolites from cultured porcine pulmonary artery endothelial cell. J. Entnopharmacol. 43 (3): 191-196.
- Wijayakusuma, H. 1997.** Khasiat rempah-rempah dan bumbu dalam makanan minuman. Makalah seminar khasiat dan keamanan rempah, bumbu dan jamu tradisional. PKMT, PAU Pangan dan Gizi dan LPM. IPB. Bogor.
- Zakaria, F.R, L. Darsana and. H. Wijaya 1996.** Immunity enhancement and cell protection activity of ginger buds and fresh ginger flesh on mouse spleen lymphocytes. In Non-Nutritive Health Factors for Future Foods. Proceedings IUFOST '96 Regional Symposium. Seoul Education and Culture Center. Seoul, Korea.
- Zakaria, F.R dan T.M. Rajab. 1999.** Pengaruh ekstrak jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) terhadap produksi radikal bebas makrofag mencit sebagai indikator imunostimulan secara invitro. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan. 707-716.

