

SENYAWA BIOAKTIF RIMPANG JAHE (*Zingiber officinale Roscoe*) MENINGKATKAN RESPON SITOLITIK SEL NK TERHADAP SEL KANKER DARAH K-562 *IN VITRO*

[Ginger Root Bioactive Compounds Increased Cytolytic Response of Natural Killer (NK) Cells Against Leucemic Cell Line K-562 *In Vitro*]

Tejasari ¹⁾, dan Fransiska Rungkat Zakaria ²⁾

1) Staf Pengajar Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Jember

2) Staf Pengajar Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, IPB

Diterima 22 Februari 2006 / Disetujui 13 November 2006

ABSTRACT

Natural killer (NK) cell, a kind of lymphocyte cells, plays an important role in attacking infectious, immature, and cancer cell. Its function could be modulated by food bioactive compounds. This experiment was conducted to investigate the effects of ginger root bioactive compounds such as oleoresin, gingerol, and shogaol on cytolytic response of NK cell *in vitro*. Lymphocyte cells were isolated by centrifugation on ficoll-hypaque density (1,77 ±0,001 g/ml) method. Leukemic cells line K-562 as target cells (TC) labelled by [³H]-thymidin, together with lymphocyte as effector cell (EC) were cultured in two ratio levels of EC : TC equal to 1:50 and 1:100, and two culture conditions, for 4 hours, respectively. Paraquat dichloride (1,1-dimethyl-4,4-bipyridilium dichloride) 3 mM was used to induce stress oxidative circumstance. Cytolytic capacity of NK cells was determined by percentage of TC lysed by NK cells, in normal and oxidative stress conditions.

Statistical analysis showed that the effects of ginger bioactive compounds on cytolytic response of NK cell depended on the culture conditions, as shown by cultures in the presence of oleoresin, and gingerol, but not shogaol. In the lymphocyte culture without stress oxidative, oleoresin, gingerol and shogaol compounds increased significantly cytolytic response of NK cells cultured at a ratio of TC : EC equal to 1:50, with the highest increment of 65 % at oleoresin concentration of 50 µg/ml. However, in culture at a ratio of TC : EC equals to 1:100, only oleoresin at a concentration of 50 µg/ml increased significantly cytolytic response of NK cells with the highest increment of 8 %. Shogaol did not affect significantly NK cells cytolytic response.

Under stress oxidative conditions, shogaol increased significantly cytolytic response of NK cells cultured at a ratio of TC:EC equal to 1:50, but the highest increment of 56 %, was by oleoresin at concentration of 50 µg/ml. Meanwhile, oleoresin and gingerol did not increase significantly cytolytic response of NK cells. At a culture-ratio of TC: EC equal to 1:100, gingerol increased significantly cytolytic response of NK cells of 21 % at a concentration of 50 µg/ml. However, oleoresin did not increase significantly cytolytic response of NK cells. In contrast, shogaol decreased significantly cytolytic response of NK cell with the highest decrease of 16 % at 200 µg/ml. These findings verified that ginger root bioactive compounds increased cytolytic response of NK cells in destroying cancer cells, at certain conditions and concentrations, especially at low concentrations.

Key words : ginger bioactive compound, oleoresin, gingerol, shogaol, stress oxidative, effector cell, target cell, natural killer cell, cytolytic response

PENDAHULUAN

Paradigma baru menilai fungsi pangan tidak hanya sebagai penyedia zat gizi bagi tubuh, dan pemenuhan selera karena rasa dan aromanya. Sekarang, makin berkembang pemikiran bahwa pangan mengandung zat aktif yang berkemampuan memodulasi proses fisiologis dan biokimiawi tubuh, termasuk sistem pertahanan tubuh. Zat tersebut, jika masuk ke dalam tubuh atau sistem hayati lainnya dapat mengubah proses fisiologis dan biokimiawi, sehingga berpengaruh terhadap kesehatan. Prinsip kerangka pikir tersebut adalah menilai makanan dan minuman tidak hanya dari rasa, aroma dan nilai gizi, namun lebih pada senyawa aktif pangan yang berfungsi dalam pencegahan, peningkatan, bahkan pengobatan dan rehabilitasi.

Pangan kelompok rempah yang biasanya digunakan sebagai bumbu dan jamu telah banyak dirasakan khasiat-sehatnya secara empiris oleh masyarakat. Antara lain, rimpang jahe (*Zingiber officinale Roscoe*), secara tradisional dikenal sebagai obat masuk angin, obat gosok, penghangat tubuh, dan untuk meningkatkan nafsu makan. Khasiat jahe secara ilmiah telah dibuktikan, antara lain sebagai antimikroba, antiseptik, mengurangi keluhan akibat influenza, memperkuat lambung, memperbaiki pencernaan (Lucas, 1979; Keys, 1981; Lienni, 1991; Paimin dan Murhananto, 1991; Tang dan Einsenbrand, 1992), mengurangi flatulensi dan kolik (Farrel, 1985), merangsang pernafasan dan jantung (Rismunandar, 1988), dan meningkatkan kesuburan wanita (Sastroamidjojo, 1988). Selain itu, rimpang jahe telah dibuktikan berfungsi

sebagai analgesik dan dalam proses antiinflamasi karena berkaitan dengan efek penghambatan biosintesis prostaglandin (Subarnas dan Sidik, 1997).

Khasiat jahe tersebut ditimbulkan oleh kandungan senyawa bioaktif jahe (Tang dan Einsenbrand, 1992). Senyawa fenolik gingerol dan zingeron memiliki sifat sporostatik terhadap *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 0,6 % (Al-Khayat dan Blank, 1985). Gingerol dan shogaol berfungsi sebagai antihepatotoksik terhadap tetraklorida (CCl_4) dan galaktosamin penyebab sitotoksik pada hati tikus (Hikino et al., 1985). Senyawa (6)-gingerol, (8)-gingerol dan (10)-gingerol dapat mengurangi aktivitas kardiotonik (Shoji et al., 1982). Sementara senyawa (6)-shogaol lebih efektif daripada (6)-gingerol dalam menekan kontraksi usus, dan bersifat antitusif (Suekawa et al., 1984). Pada sistem *in vitro*, senyawa oleoresin, gingerol, dan shogaol meningkatkan proliferasi sel limfosit B dan sel T (Tejasari, et al., 2002).

Pada akhir abad ke-19, secara *in vitro* dan *in vivo*, dibuktikan bahwa ekstrak jahe memberi efek positif terhadap respons proliferasif dan sitolitik limfosit. Selain itu, ekstrak etanol jahe segar secara *in vitro* meningkatkan proliferasi splenosit dan menurunkan tingkat kematian sel (Zakaria et al., 1996). Kemampuan sel *Natural Killer* (NK) dalam melisis alur sel kanker (*cell line*) sel target YAC-1 meningkat pada mencit yang diberi ekstrak air jahe (Prangdimurti, 1999). Aktivitas sitolitik sel NK meningkat (Zakaria et al., 1999) pada subjek manusia yang mengkonsumsi jahe selama satu bulan. Studi pada subjek manusia menjelaskan bahwa konsumsi sari jahe selama 30 hari meningkatkan aktivitas sitolitik sel NK (Nurrahman, 1998; Zakaria et al., 2003).

Tujuan umum studi ini ialah untuk mengetahui pengaruh zat aktif dalam senyawa oleoresin jahe terhadap fungsi sel NK. Tujuan khusus telaah ini untuk menentukan jenis zat bioaktif dalam senyawa oleoresin jahe yang meningkatkan respons sitolitik sel NK dalam melisis sel kanker darah K-562 secara *in vitro*. Lebih lanjut, percobaan ini bertujuan untuk menentukan hubungan antara zat bioaktif dalam senyawa oleoresin jahe dan respons sitolitik sel NK dalam melisis sel kanker darah pada sistem *in vitro*.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan baku yang digunakan pada studi ini adalah rimpang jahe gajah (*Zingiber officinale* Roscoe) umur 11 bulan, yang berasal dari Bogor. Bahan kimia dari Sigma-USA, yaitu paraquat atau 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylum dichloride (M-2254), larutan ficoll hypaque (1077-1), media RPMI 1640 (R-7755), gentamisin (G-1522), L-glutamin (G-2150), [3H]-timidin (32,222-9), mitogen lipopolisakarida atau LPS (L-6143) dan fitohemaglutinin atau PHA (L-9132), larutan sintilasi,

triton X-100 (T-8787), dan phosphate buffered saline atau PBS (P-3813). Pelarut murni dari E-Merck yaitu etanol, heksan, dietileter, aseton dan butanol, asam sulfosalisilat, pereaksi folin denis, asam tanat, folin *ciaocalcateu*, dan gas nitrogen. Bahan biologis, yaitu sel limfosit dari subyek manusia dan serum AB dari sukarelawan, sedangkan sel target K-562 (*erythro leukemic cell line*) dari Laboratorium Imunologi U.S. NAMRU-2, Jakarta.

Peralatan yang digunakan untuk analisis kimia dan fraksinasi komponen oleoresin rimpang jahe meliputi *freeze dryer*, peralatan *soxhlet*, *shaker*, alat sentrifus (IEC Centra-CLD), lempeng kromatografi lapis tipis GF 254 dengan tebal 0,2 mm (E-Merck), wadah pengembang, *rotary evaporator* (Buchi 461) dan alat-alat gelas. Alat untuk analisis kultur sel meliputi *repeater pipet*, *laminar flow* (lab.gard Class II, Type A/B2, model NU-407-600), inkubator (CO_2 water-jacketed incubator, model NU-2700E), alat sentrifusi (Beckman GS-6, GH-3.8 Horizontal Rotor), hemasitometer (Neubauer), mikroskop fluoresens (Nicon, Optihot-2), mikroskop *inverted* (Diaphot-200), alat panen sel (model 200A Cambridge Technology Inc.), *B-counter* (Beckman). Peralatan habis pakai yaitu : lempeng mikrotiter 96 sumur (Thomas Co. Labware), pipet, pipet mikro, tabung reaksi 15 ml dan 50 ml, tabung *falcon 5 ml*, tabung *venoject*, alat suntik dengan jarum butterfly No. 23, membran filter 1 μm (Gelman sciences), *acrodish* 0,22 μm (Millipore) dan lempeng piko (Packard TOP *picoplate Scintillation*).

Metode penelitian

Rancangan penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium (*Pure Experiment*) dan terdiri atas 3 tahap percobaan utama, yaitu 1) analisis kimia komponen rimpang jahe segar dan fraksinasi komponen oleoresin rimpang jahe, 2) uji efek dosis toksik parakuat untuk induksi kondisi stres oksidatif, dan 3) uji efek komponen oleoresin rimpang jahe terhadap respons sitolitik sel *Natural Killer* (NK), yang dibiakkan dalam kondisi normal, dan kondisi stres oksidatif secara terpisah. Percobaan tahap 1 dilakukan di Laboratorium Kimia Pangan PAU Pangan dan Gizi IPB, sedangkan tahap 2, dan 3, yang meliputi kultur sel dilakukan di laboratorium Virologi, Pusat Studi Satwa Primata IPB (PSSP-IPB) Bogor. Panen sel NK dilakukan di Laboratorium Biokimia Departemen TPG-IPB, sementara pembacaan sel NK dilakukan di Laboratorium Imunologi U.S. NAMRU-2 (*United States, Naval Medical Research Unit-2*) di Jakarta.

Rancangan percobaan

Percobaan *in vitro* (tahap 2-3) untuk mempelajari pengaruh penambahan senyawa oleoresin (OL), gingerol (GR) dan shogaol (SH) terhadap limfosit manusia dilakukan secara terpisah. Setiap senyawa

oleoresin atau komponennya dicobakan pada empat taraf konsentrasi, yaitu 50, 100, 150 dan 200 µg/ml, dan ditambah satu kontrol (KTR). Berbagai taraf konsentrasi ini dicobakan dalam dua keadaan kultur, yaitu tanpa stres oksidatif (tanpa penambahan paraquat atau PQ) dan dengan stres oksidatif (dengan penambahan PQ), sehingga terdapat delapan kombinasi perlakuan, dan kontrol. Setiap kombinasi perlakuan ini selanjutnya diulang sebanyak tiga kali.

Penambahan senyawa oleoresin, zat aktif gingerol dan shogaol secara terpisah dilakukan secara acak sesuai kombinasi perlakuan dan kontrol. Oleh karena itu, percobaan dirancang sebagai rancangan acak lengkap dengan perlakuan faktorial. Pengacakan perlakuan pada percobaan biologis pada kondisi homogen dan terkontrol dimaksudkan untuk menghindari bias sistematis (Haaland, 1989). Secara skematis, rancangan percobaan ditunjukkan pada Tabel 1.

Analisis kadar total fenol ekstrak jahe

Pereaksi *folin denis* dibuat dari campuran 100 g Na₂WO₄.2H₂O, 20 g asam fosfomolibdat, 50 ml H₃PO₄ dan 750 ml akuades. Campuran direfluks selama 1 jam dan setelah dingin ditepatkan volumenya menjadi satu liter dengan akuades. Larutan standar asam tanat dibuat dengan seri konsentrasi sebagai berikut . 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 mg/ml dengan penambahan akuades. Campuran 75 ml akuades, 5 ml pereaksi *folin denis* dan 10 ml larutan Na₂CO₃ 14% ditambahkan ke dalam labu takar yang berisi 0,1 ml ekstrak jahe, lalu ditepatkan menjadi 100 ml dengan akuades. Setelah dikocok selama satu menit, dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang, lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 760 nm

Tabel 1. Rancangan percobaan pengaruh zat bioaktif jahe terhadap fungsi sel NK

Tanpa stres oksidatif			Dengan stres oksidatif		
1. Perlakuan senyawa oleoresin (OL)					
OL ₅₀₋₁	OL ₅₀₋₂	OL ₅₀₋₃	OL ₅₀₋₁ PQ	OL ₅₀₋₂ PQ	OL ₅₀₋₃ PQ
OL ₁₀₀₋₁	OL ₁₀₀₋₂	OL ₁₀₀₋₃	OL ₁₀₀₋₁ PQ	OL ₁₀₀₋₂ PQ	OL ₁₀₀₋₃ PQ
OL ₁₅₀₋₁	OL ₁₅₀₋₂	OL ₁₅₀₋₃	OL ₁₅₀₋₁ PQ	OL ₁₅₀₋₂ PQ	OL ₁₅₀₋₃ PQ
OL ₂₀₀₋₁	OL ₂₀₀₋₂	OL ₂₀₀₋₃	OL ₂₀₀₋₁ PQ	OL ₂₀₀₋₂ PQ	OL ₂₀₀₋₃ PQ
2. Perlakuan komponen gingerol (GR)					
GR ₅₀₋₁	GR ₅₀₋₂	GR ₅₀₋₃	GR ₅₀₋₁ PQ	GR ₅₀₋₂ PQ	GR ₅₀₋₃ PQ
GR ₁₀₀₋₁	GR ₁₀₀₋₂	GR ₁₀₀₋₃	GR ₁₀₀₋₁ PQ	GR ₁₀₀₋₂ PQ	GR ₁₀₀₋₃ PQ
GR ₁₅₀₋₁	GR ₁₅₀₋₂	GR ₁₅₀₋₃	GR ₁₅₀₋₁ PQ	GR ₁₅₀₋₂ PQ	GR ₁₅₀₋₃ PQ
GR ₂₀₀₋₁	GR ₂₀₀₋₂	GR ₂₀₀₋₃	GR ₂₀₀₋₁ PQ	GR ₂₀₀₋₂ PQ	GR ₂₀₀₋₃ PQ
3. Perlakuan komponen shogaol (SH)					
SH ₅₀₋₁	SH ₅₀₋₂	SH ₅₀₋₃	SH ₅₀₋₁ PQ	SH ₅₀₋₂ PQ	SH ₅₀₋₃ PQ
SH ₁₀₀₋₁	SH ₁₀₀₋₂	SH ₁₀₀₋₃	SH ₁₀₀₋₁ PQ	SH ₁₀₀₋₂ PQ	SH ₁₀₀₋₃ PQ
SH ₁₅₀₋₁	SH ₁₅₀₋₂	SH ₁₅₀₋₃	SH ₁₅₀₋₁ PQ	SH ₁₅₀₋₂ PQ	SH ₁₅₀₋₃ PQ
SH ₂₀₀₋₁	SH ₂₀₀₋₂	SH ₂₀₀₋₃	SH ₂₀₀₋₁ PQ	SH ₂₀₀₋₂ PQ	SH ₂₀₀₋₃ PQ

Analisis kimia komponen rimpang jahe gajah segar

Persiapan ekstrak air jahe dan tepung jahe

Sejumlah 50 gram irisan jahe segar dihancurkan dengan 500 ml akuades dalam blender. Hancuran jahe dipanaskan pada suhu 50° C di dalam penangas air selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh dari penyaringan kasar melalui kertas saring Whatman no. 42 didiamkan selama satu jam. Bagian bening diambil dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Ekstrak air jahe diperoleh melalui penyaringan *supernatan* dengan kertas Whatman no. 42. Tepung jahe diperoleh dari penghancuran irisan jahe kering beku dengan kadar air lebih kecil dari 5 persen dan penyaringan ukuran 60 mesh.

Analisis kadar senyawa oleoresin dan fraksinasi komponen oleoresin jahe

Sejumlah 20 gram tepung jahe dibungkus dengan kertas saring biasa dan direndam dengan 300 ml etanol pada alat soxhlet lalu dipanaskan pada suhu 70° C, selama 4-8 jam. Ekstrak etanol jahe yang diperoleh berisi senyawa oleoresin. Senyawa oleoresin diperoleh setelah pelarut etanol diuapkan dengan *rotary evaporator*.

Analisis kualitatif : lempeng GF-254 yang telah diaktifkan dengan pemanasan pada suhu 110° C selama 4 jam diberi spot ekstrak yang berisi senyawa oleoresin dimulai pada garis batas lalu dimasukkan ke dalam wadah pengembang yang telah jenuh dengan eluen heksan dan dietileter dengan rasio 3 : 7, dan dibiarkan perambatan eluen sampai batas akhir. Plat tersebut dikeluarkan dari wadah pengembang, dan terlihat fraksi yang terpisah satu sama lainnya karena memiliki nilai Rf

(*Retardation Factor*) yang berbeda. Nilai *rf* merupakan rasio jarak yang ditempuh oleh zat yang larut (spot awal sampai posisi fraksi yang bersangkutan) terhadap jarak yang ditempuh oleh eluen (spot awal sampai batas akhir). Penyemprotan dengan larutan *folin ciocalteu* dilakukan untuk pembenaran fraksi 1 sebagai gingerol, dan fraksi 2 sebagai shogaol.

Analisis kuantitatif : prosedur untuk analisis kuantitatif sama dengan analisis kualitatif, hanya konsentrasi ekstrak etanol lebih tinggi, yaitu 10%. Beberapa fraksi muncul pada posisi yang sama, dan tidak berbentuk spot melainkan berupa luasan tertentu sesuai kadar setiap fraksi. Fraksi 1 (gingerol) dan 2 (shogaol) diekstrak dari silika dengan pelarut aseton (10-30 ml) lalu dilakukan sentrifus 2800 x g selama 15 menit, dan supernatan diambil. Sentrifus dilakukan beberapa kali hingga endapan silika tidak berwarna kecoklatan. *Supernatan* disaring dengan kertas saring whatman no. 42, sehingga didapat ekstrak aseton yang berisi komponen fraksi 1 (gingerol) atau fraksi 2 (shogaol). Aseton diuapkan dengan *evaporator* dan dilanjutkan dengan gas nitrogen untuk menghilangkan residunya.

Persiapan senyawa dan zat bioaktif jahe, larutan paraquat (PQ), dan medium biakan

Persiapan Senyawa dan Bioaktif Jahe : Senyawa oleoresin, gingerol dan shogaol dilarutkan secara terpisah dalam media RPMI 1640. Pengenceran bertingkat dilakukan untuk mendapatkan larutan stok dengan tingkat konsentrasi masing-masing 500, 1000, 1500 dan 2000 µg/ml. Larutan stok disterilkan dengan penyaringan membran berpori 0,22 µm.

Persiapan Larutan Paraquat : Paraquat diklorida atau 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylum dichloride (BM = 257,2) ditimbang sejumlah 0,02572 gr dan dilarutkan dalam 10 ml RPMI 1640 untuk mendapatkan larutan stok 10 mM. Pengenceran bertingkat dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan 4 tingkat konsentrasi yaitu 1,2,3 dan 4 mM. Larutan disterilkan dengan penyaringan membran berpori 0,22 µm.

Persiapan Medium Biakan : Medium yang digunakan ada tiga jenis yaitu media basal, media semi lengkap dan media lengkap. Media basal digunakan untuk pencucian dan dibuat dari bubuk RPMI-1640 sebanyak 10,42 gram dilarutkan dengan akuades steril hingga satu liter, lalu ditambah 2 gram NaHCO₃. Medium semi lengkap merupakan media basal yang ditambah 1 % L-glutamin 2 mM dan 1 % antibiotik gentamisin. Media lengkap digunakan untuk media pertumbuhan limfosit, dan dibuat dengan penambahan 20 % serum dari darah manusia golongan AB. Untuk analisis sel NK ditambahkan *fetal bovine serum*. Semua larutan media disterilkan dengan penyaringan membran berpori 0,22 µm.

Isolasi limfosit, suspensi limfosit dan kultur limfosit (modifikasi Freshney, 1994)

Analisis profil darah dilakukan dengan metode *Quick Blood Count* (QBC) di klinik Caritas Bogor. Pengambilan darah perifer dilakukan oleh asisten transfusi darah (Atd) pada pagi hari di rumah sakit PMI Bogor. Setelah diberi *informed concern*, darah diambil dari subyek seorang lelaki dewasa sehat berusia 24 tahun secara aseptis dengan alat suntik dan jarum *butterfly* No. 23 sekali pakai. Sampel darah ditempatkan dalam tabung *venoject* steril yang berisi antikoagulan 10 % sodium sitrat.

Limfosit diisolasi dari sampel darah perifer dengan metode sentrifus berdasarkan perbedaan densitas larutan *ficoll-hypaque* (1,77 ± 0,001 g/ml). Sentrifusi pertama dilakukan pada kecepatan 514 x g selama 10 menit untuk pemisahan komponen seluler. Sel darah merah berada di bagian bawah, sedangkan plasma darah terpisah di bagian atas. Lapisan *buffy coat* yang sebagian besar berisi sel limfosit berada di antara kedua lapisan. Lapisan *buffy coat* diambil lalu ditambahkan ke dalam 3 ml media basal. Selanjutnya, lapisan *buffy coat* dalam media basal dilewatkan di atas larutan *ficoll-hypaque* secara perlahan sehingga terbentuk dua lapisan yang tidak bercampur. Kemudian disentrifusi pada 1430 x g selama 30 menit. Sel limfosit, monosit dan platelet berada di lapisan atas permukaan *ficoll* dan tidak menembus ke bawah, sedangkan granulosit dan sel darah merah terpisah di dasar tabung sentrifus. Lapisan yang berisi sel limfosit, monosit dan platelet dicuci 2 kali dengan media basal dan disentrifusi pada 228 x g selama 10 menit. Akhirnya, limfosit (dalam presipitat) terpisah dari platelet, monosit, plasma dan *ficoll* (dalam supernatan). Sel limfosit tersebut dihitung dengan pewarnaan biru trifan pada hemasitometer. Suspensi limfosit dengan jumlah sel yang hidup di atas 95 % tersebut disiapkan dengan media basal untuk berbagai konsentrasi yaitu : 2x 10⁶ sel/ml, 1x 10⁵ sel/ml, 1x 10⁷ sel/ml dan 5x 10⁵ sel/ml.

Sejumlah 100 µl suspensi limfosit homogen dibagikan ke 30 sumur pada lempeng mikro berukuran 200 µl sehingga limfosit ada dalam jumlah tertentu sesuai metode untuk pengukuran parameter yang diuji. Larutan paraquat ditambahkan untuk induksi kondisi kultur stres oksidatif. Selanjutnya ditambahkan masing-masing senyawa oleoresin, komponen gingerol atau shogaol ke sumur lempeng mikro secara acak, dan dilakukan 3 kali ulangan. Pada kontrol hanya ditambahkan media saja. Kemudian, lempeng mikro dimasukkan ke dalam inkubator tekanan O₂ 95% dan CO₂ 5% serta suhu inkubasi 37 °C untuk waktu 4 jam. Setelah selesai inkubasi lempeng mikro dikeluarkan untuk dipanen dengan *cell harvester*, dan di simpan pada suhu -20° C untuk kemudian dihitung jumlah sel limfosit per menit yang disebut sebagai *count per minute* (CPM) dengan *β-counter*.

Analisis respons sitolitik sel NK

Sel target yang digunakan adalah sel kanker darah merah K-562 (Roitt, 1991). Sel target disuspensi dan ditetapkan konsentrasinya menjadi 1×10^5 sel/ml dengan media lengkap berisi 10 % serum janin sapi (SJS). Pelabelan dilakukan dengan penambahan $[^3\text{H}]$ -timidin $2 \mu\text{Ci/ml}$ dan inkubasi selama semalam dalam inkubator CO_2 5 % dan suhu 37°C . Setelah sel target diinkubasi lalu dicuci dengan media basal melalui sentrifusi pada $228 \times g$ selama 10 menit. Pelet diambil dan dibuat suspensi sel target dengan konsentrasi 1×10^5 sel/ml dalam medium lengkap.

Sejumlah $50 \mu\text{l}$ sel target (ST) 1×10^5 sel/ml terlabel dibiakkan dengan $50 \mu\text{l}$ sel efektor (SE) 1×10^7 sel/ml dan $20 \mu\text{l}$ SJS dalam sumur pada lempeng mikrotiter yang telah diberi $80 \mu\text{l}$ senyawa oleoresin, gingerol dan shogaol secara terpisah (Gambar 2). Selanjutnya lempeng mikrotiter tersebut diinkubasi selama empat jam dalam inkubator CO_2 5 %, pada suhu 37°C . Kultur dilakukan juga dengan rasio ST:SE = 1: 50. Pada kontrol, sel target dibiakkan dengan medium pertumbuhan saja.

Sel dipanen dengan alat *cell harvester*. Membran filter pada alat tersebut menahan inti sel dan sel utuh yang terlabel dengan $[^3\text{H}]$ -timidin. Setelah dikeringanginkan, filter tersebut dimasukkan ke dalam sumur pada lempeng piko 24 sumur dan diberi larutan sintilasi untuk dibaca menggunakan β -counter. Nilai CPM yang dibaca oleh β -counter adalah jumlah sel target berlabel $[^3\text{H}]$ -timidin yang tidak lisis atau masih utuh. Persen lisis (%) terhadap sel target merupakan rasio CPM sel K562 pada medium dengan perlakuan yang lisis terhadap CPM K562 kontrol pada medium standar (Rose et al., 1994). Persen lisis tersebut menggambarkan respons sitolitik sel NK (Roitt, 1991).

Analisis data

Studi ini menggunakan rancangan percobaan acak lengkap dengan rancangan perlakuan faktorial sehingga model percobaannya sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad ; \quad i = 1, \dots, 5 \quad , \quad j = 1, 2 \quad , \quad \text{dan} \quad k = 1, 2, 3$$

Y_{ijk} = nilai pengamatan ke k yang memperoleh perlakuan ke i pada kondisi j.

μ = nilai tengah pengamatan

A_i = pengaruh perlakuan ke-i

B_j = pengaruh kondisi kultur ke-j

AB_{ij} = pengaruh interaksi perlakuan ke-i dan kondisi kultur ke-j

ϵ_{ijk} = pengaruh galat pada pengamatan ke-k, perlakuan ke -i dan kondisi ke-j

Analisis ragam (ANOVA) pada model percobaan digunakan untuk menilai pengaruh konsentrasi dan kondisi kultur limfosit serta pengaruh interaksinya,

masing-masing untuk senyawa oleoresin, gingerol, dan shogaol. Model regresi digunakan untuk menyimpulkan model hubungan antara respons dengan konsentrasi senyawa aktif jahe dan kondisi biakan limfosit. Model ini mencakup model linier maupun tak linier sesuai perilaku data. Berdasarkan sebaran data, model respons hubungan yang terjadi adalah bersifat linier, kuadratik, kubik, dan eksponensial, yang digambarkan dalam persamaan matematis sebagai berikut : $Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X^2 + \beta_2 X + \epsilon_{ij}$; $Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3 + \epsilon_{ij}$; $Y_{ij} = \beta_0 e^{-\beta_1 k}$

dimana Y = respons limfosit, X = konsentrasi jahe, β_0 = kemiringan (slope) garis yang melalui nilai tengah populasi Y, dan $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = intersep populasi, k= konstanta (Steel and Torrie, 1980; Mead et al., 1993). Analisis ragam dan regresi dilakukan menggunakan program statistik *Statistical Analysis System (SAS) for Windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa bioaktif jahe (*zingiber officinale roscoe*)

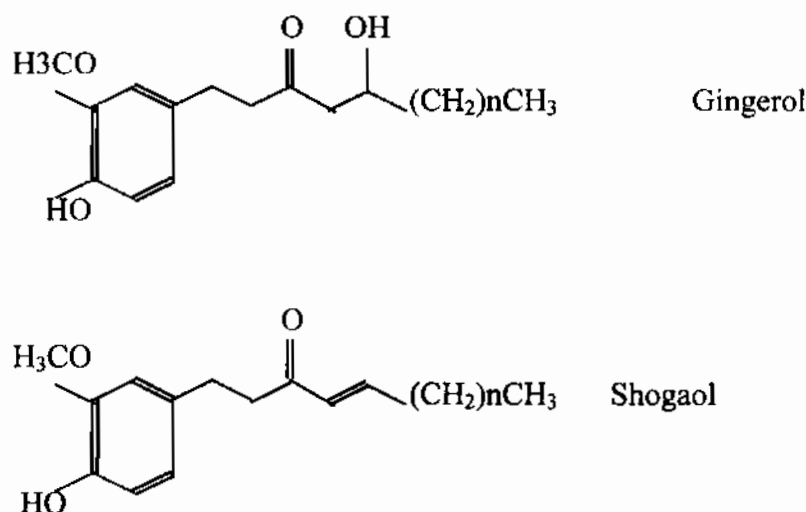
Oleoresin adalah senyawa fenolik yang memiliki banyak gugus hidroksil. Oleoresin jahe, yang diperoleh dengan metode ekstraksi etanol, mengandung 5 komponen yang kemudian dikenal dengan zat aktif non volatil jahe. Fraksinasi senyawa oleoresin dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan ada lima fraksi, yaitu fraksi 1 hingga 5 (Tabel 2). Berdasarkan telaah Kikuzaki and Nakatani (1993), Chen et al., (1986), dan Wikandari (1994) fraksi ke-1 dan ke-2 berturut-turut adalah senyawa gingerol dan shogaol. Struktur kimia kedua senyawa fenol sederhana tersebut disajikan pada Gambar 1.

Tabel 2. Perbandingan antara nilai rf hasil analisis KLT studi ini dan referensi

No. Fraksi	Nilai rf		
	Yang diperoleh studi ini	Referensi 1)	Referensi 2)
1	0,24	0,20 - 0,24	0,15 - 0,22
2	0,42	-----	0,42
3	0,54	0,41 - 0,48	0,48 - 0,55
4	0,60	0,51 - 0,57	0,58 - 0,62
5	0,68	0,65 - 0,67	0,68 - 0,72

1) Wikandari (1994)

2) Chen et al., (1986)



Gambar 1. Struktur kimia senyawa gingerol dan shogaol

Senyawa gingerol dan shogaol bersifat lebih polar daripada ketiga senyawa fraksi lain. Adapun gingerol bersifat lebih polar daripada shogaol (Nakatani, 1993). Oleh karena itu, gingerol muncul pada fraksi dengan nilai *r_f* yang terkecil. Hal ini disebabkan adsorben gel silika (SiO₂) pada permukaan plat KLT bersifat polar sehingga lebih kuat menyerap molekul gingerol terlebih dahulu. Selain itu, pelarut heksan dan dietileter sebagai fase gerak bersifat non polar sehingga lebih menarik komponen yang non polar ke bagian atas lempeng dan meninggalkan komponen polar di bagian bawah lempeng KLT. Kedua senyawa bioaktif jahe tersebut diduga memberi efek positif terhadap kemampuan sel NK dalam melisis sel kanker darah. Kadar senyawa gingerol (0,52 persen b.k) lebih besar dari shogaol (0,24 persen b.k.).

Senyawa gingerol dan shogaol memiliki banyak gugus hidroksil sehingga bersifat polar dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Hudson, 1990). Kikuzaki dan Nakatani (1993) telah membuktikan bahwa (6)-gingerol, (6)-shogaol dan (6)-gingerdiol memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dari α -tokoferol. Senyawa (6)-, (8)- dan (10)- gingerol yang ada dalam ekstrak etanol jahe segar diduga menstimulasi aktivitas splenosit dan menurunkan tingkat kematiannya selama inkubasi (Zakaria dkk., 1996). Berdasarkan temuan tersebut, diduga mekanisme efek proteksi komponen oleoresin rimpang jahe tersebut adalah melalui stimulasi respons imun (imunomodulasi) dan sifat antioksidatif sehingga mampu melindungi sel dari kerusakan oksidatif.

Respons sitolitik sel NK

Sel NK adalah sel efektor sitolitik (SE) non spesifik terhadap sel target (ST), seperti : sel terinfeksi virus dan sel kanker. Pada manusia dewasa, sel NK berjumlah 10-15 persen dari jumlah sel limfosit darah tepi (Kuby, 1992; Kleinsmith dan Kish, 1995). Analisis QBC subyek menunjukkan limfosit total berjumlah $1,5 \times 10^6$ per

mL. Jumlah sel NK darah tepi yang diuji berjumlah 15 persen dari total limfosit, yaitu sekitar $22,5 \times 10^4$ sel per mL.

Pada kondisi normal (tanpa stres oksidatif) dan setelah diinkubasi selama 4 jam, jumlah sel kanker yang masih utuh (1624 sel) pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:50, dan 1060 sel pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:100. Sebaliknya, pada kondisi stres oksidatif dan inkubasi 4 jam, jumlah sel kanker (CPM) yang masih utuh 1722 sel pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:50, dan 1140 sel pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:100. Pada dua kondisi biakan, jumlah sel target pada biakan sel dengan nisbah ST:SE = 1:50 lebih sedikit daripada kondisi biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:100. Hal tersebut terjadi karena jumlah sel NK pada biakan ST:SE=1:100 lebih banyak daripada biakan ST:SE = 1:50 sehingga lebih banyak sel kanker yang lisis.

Respons sitolitik sel NK adalah aktivitas sel NK dalam melisis sel target K562 dalam biakan (*in vitro*), dan dinyatakan sebagai persen lisis. Persen lisis merupakan nisbah antara jumlah sel K562 yang lisis terhadap jumlah sel K562 yang masih utuh pada kelompok kontrol, dalam persen. Semakin banyak sel K562 yang lisis, semakin kecil nilai CPM hasil pembacaan sinar β (dari ³H-timidin terlabel pada sel K562 yang utuh) oleh β -counter. Hal tersebut berarti memperbesar persen lisis atau meningkatkan respons sitolitik sel NK.

Pada kondisi normal, dan biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:50, senyawa oleoresin, gingerol, dan shogaol meningkatkan respons sitolitik sel NK. Nilai persen lisis tertinggi terjadi pada penambahan oleoresin 50 μ g/ml, gingerol 50 μ g/ml, dan shogaol 200 μ g/ml, yaitu sebesar 60 %, 52 %, dan 53 % berturut-turut, versus 36,4 % pada biakan kontrol. Sementara, pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:100, hanya penambahan oleoresin 50 dan 100 μ g/mL yang meningkatkan respons sitolitik sel NK dengan nilai

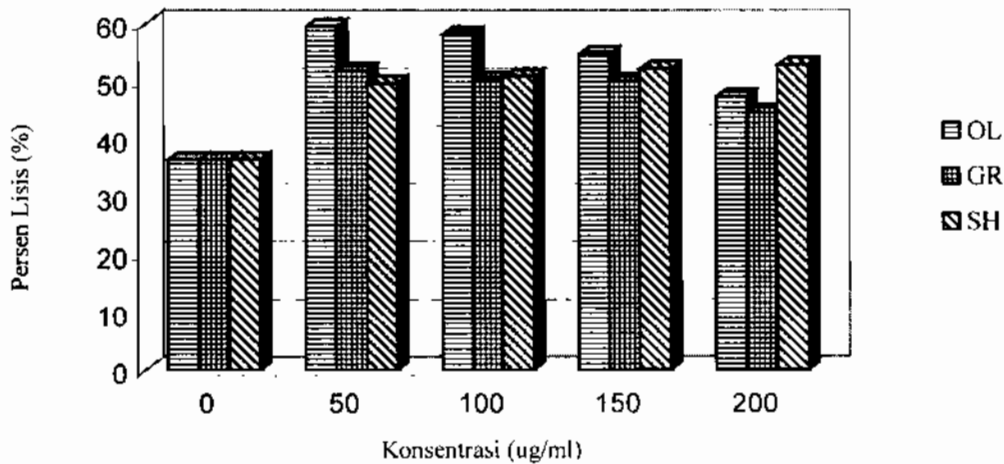
persen lisis tertinggi sebesar 63 %, versus 58,5 % pada biakan kontrol. Kedua senyawa lainnya, yaitu gingerol dan shogaol tidak meningkatkan respons sitolitik sel NK (Gambar 2).

Pada kondisi stres oksidatif, dan biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:50 dan senyawa aktif jahe senyawa oleoresin, gingerol, dan shogaol mengakibatkan peningkatan respons sitolitik sel NK. Persen lisis tertinggi juga terjadi pada penambahan senyawa oleoresin 50 µg/mL, yaitu 69 %, versus 32,5 % pada biakan kontrol. Pada biakan sel dengan nisbah ST: SE = 1:100, senyawa oleoresin dan gingerol jahe tersebut meningkatkan respons sitolitik sel NK, tidak pada shogaol. Respons sitolitik sel NK tertinggi terjadi pada penambahan oleoresin 50 µg/mL dan gingerol

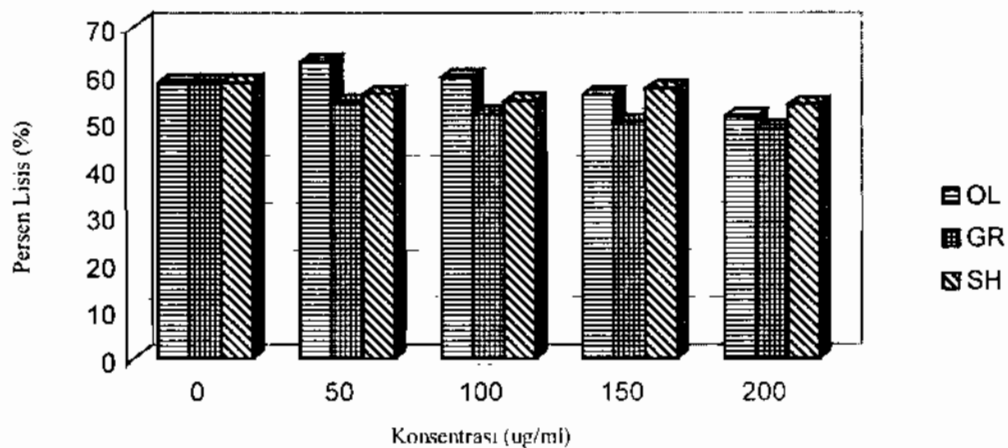
50 µg/mL, yaitu 70 % dan 67%, versus 58,5 % pada kontrol (Gambar 3)

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:50 dan ST:SE=1:100, kondisi biakan berpengaruh terhadap kemampuan oleoresin, dan gingerol dalam memodulasi respons sitolitik sel NK. Sebaliknya, pengaruh shogaol terhadap respons sitolitik sel NK tidak tergantung pada kondisi biakan. Artinya, pada kedua kondisi biakan, respons sitolitik sel NK mengikuti pola respons yang sama atau tidak berbeda. Sementara, hasil uji pengaruh senyawa aktif jahe terhadap respons sitolitik sel NK pada dua jenis nisbah biakan ST:SE dan dua kondisi biakan disajikan pada Tabel 3.

a) Biakan sel ST : SE = 1 : 50

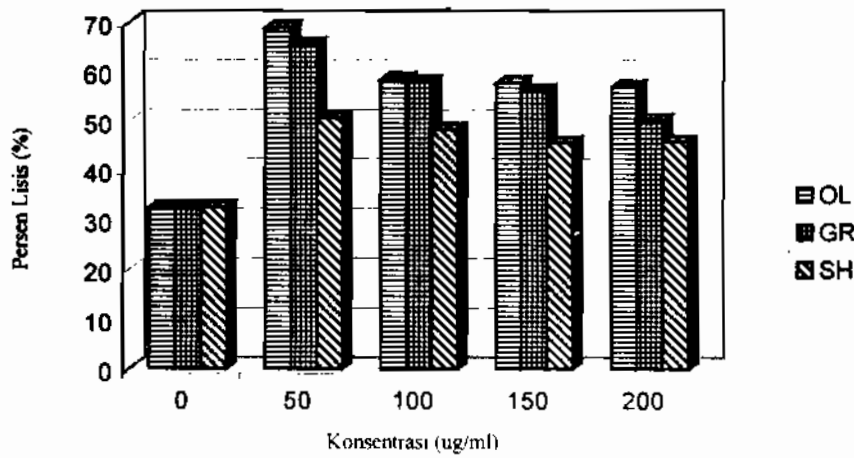


b) Biakan sel ST . SE = 1 : 100

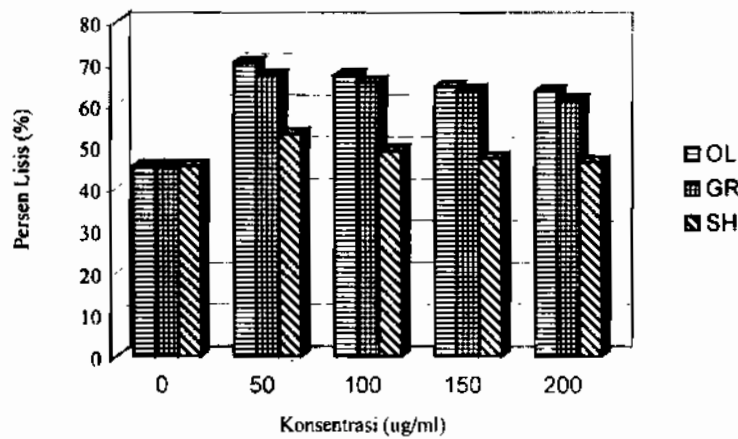


Gambar 2. Persen Lisis (%) sel NK sebagai respons penambahan senyawa oleoresin, gingerol dan shogaol pada biakan sel a) ST:SE=1:50, dan b) ST:SE=1:50 dan kondisi normal

a) Biakan ST : SE = 1 : 50



b) Biakan ST : SE = 1 : 100



Gambar 3 Persen Lisis (%) sel NK sebagai respons penambahan senyawa oleoresin, gingerol, dan shogaol pada biakan sel a) ST:SE=1:50, dan b) ST:SE=1:50 dan kondisi stres oksidatif

Tabel 3. Hasil Uji Pengaruh Senyawa Bioaktif Jahe terhadap Respons sitolitik sel NK pada biakan limfosit dengan nisbah ST:SE = 1:50 dan 1:100 dan dua kondisi biakan sel

Respons Sitolitik Yang diuji	Komponen Bioaktif	Nilai-F	
		Normal	Stres Oksidatif
1. Aktivitas sitolitik sel NK (%) (ST:SE=1:50)	Oleoresin	0,0007 *	0,0 ^{tn}
	Gingerol	0,0077 *	0,0 ^{tn}
	Shogaol	0,0 ^{tn}	0,0008 *
2. Aktivitas sitolitik sel NK (%) (ST:SE=1:100)	Oleoresin	0,0001 *	0,0 ^{tn}
	Gingerol	0,0006 *	0,0004 *
	Shogaol	0,0 ^{tn}	0,001 *

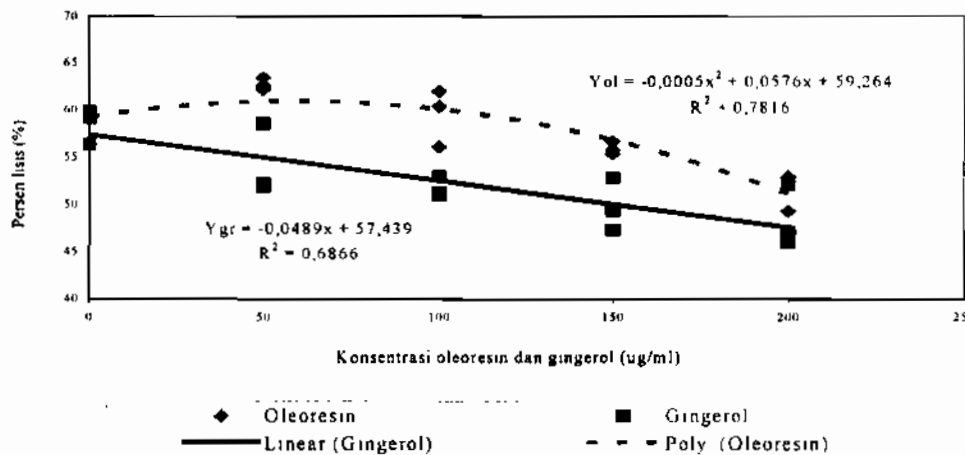
Pada kondisi normal, dan biakan sel dengan nisbah ST:SE = 1:50 dan ST:SE = 1:100, senyawa oleoresin dan gingerol berpengaruh nyata terhadap respons sitolitik sel NK, sebaliknya shogaol tidak. Respons sitolitik sel NK tertinggi terhadap penambahan oleoresin 50 µg/mL sebesar 63 % dan 60 %, masing-masing pada biakan sel dengan nisbah ST:SE = 1:50 dan ST:SE = 1:100. Akibat penambahan tersebut terjadi peningkatan respons sitolitik sel NK sebesar 4 % dan 24 %. Hubungan respons sitolitik sel NK akibat penambahan oleoresin dan gingerol masing-masing adalah kuadratik dan linier negatif (Gambar 4). Semakin tinggi konsentrasi gingerol, respons sitolitik sel NK secara kuadratik dan linier semakin menurun. Peningkatan dan penurunan respons sitolitik sel NK, yang dibiakkan pada dua tingkat nisbah, sebagai akibat penambahan shogaol tidak nyata.

Analisis statistik tersebut di atas membuktikan bahwa pada biakan limfosit dalam kondisi tanpa stres oksidatif, senyawa oleoresin dan gingerol pada konsentrasi rendah mampu meningkatkan fungsi sitolitik sel NK untuk melisis sel target K562. Peningkatan respons sitolitik sel NK kemungkinan disebabkan oleh aktivasi senyawa oleoresin dan gingerol terhadap sel NK untuk mengeluarkan faktor sitotoksiknya, yaitu perforin atau sitolisin. Menurut Kuby (1992), setelah kontak atau pelekatan sel NK ke sel target, granula sitoplasmik yang berisi perforin mengalami degranulasi. Perforin menyebabkan terbentuknya lubang pada membran sel target, dan dalam waktu 15 menit sampai 3 jam berakibat

pada fragmentasi DNA, yang berakibat pada kerusakan sel target. Sebaliknya, penurunan aktivitas sitolitik sel NK dapat terjadi karena ketidaklengkapan biokimiawi dalam proses pembunuhan sel target, antara lain ketidakmampuan pengenalan sel target (Sherman dan Lockwood, 1987).

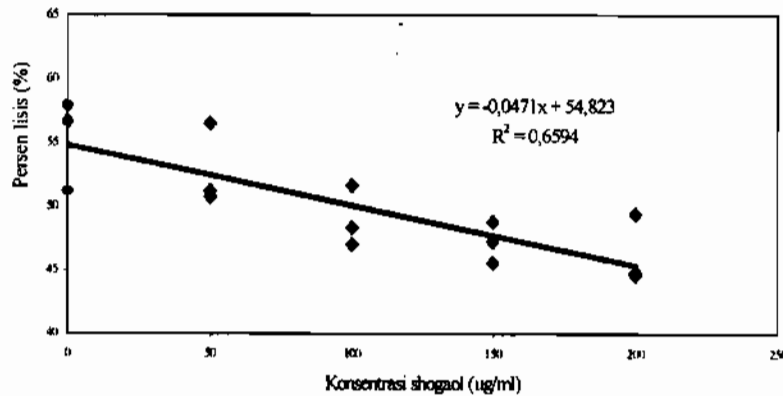
Sebagai perbandingan, studi Prangdimurti (1998) telah membuktikan bahwa pada sistem *in vitro* pemberian ekstrak jahe pada mencit yang diberi PQ meningkatkan aktivitas sitolitik sel NK sebesar 41,80 persen. Demikian pula studi Zakaria et al., (1999) dan Zakaria et al., 2003 pada sistem *in vivo* membuktikan bahwa konsumsi sari jahe meningkatkan aktivitas sitolitik sel NK manusia dalam melisis sel target K562.

Pada kondisi stres oksidatif dan biakan sel dengan nisbah ST:SE = 1:50, hanya shogaol yang berpengaruh terhadap respons sitolitik sel NK. Sementara pada biakan sel dengan nisbah ST:SE = 1:100, senyawa gingerol dan shogaol berpengaruh terhadap respons sitolitik sel NK (Tabel 3). Penambahan shogaol berpengaruh nyata terhadap penurunan respons sitolitik sel NK. Kurva respons sitolitik sel NK terhadap penambahan shogaol bersifat linier negatif (Gambar 5). Artinya semakin tinggi konsentrasi shogaol yang diberikan, aktivitas sitolitik sel NK semakin kecil. Peningkatan respon sitolitik sel NK akibat penambahan oleoresin, dan gingerol tidak nyata.

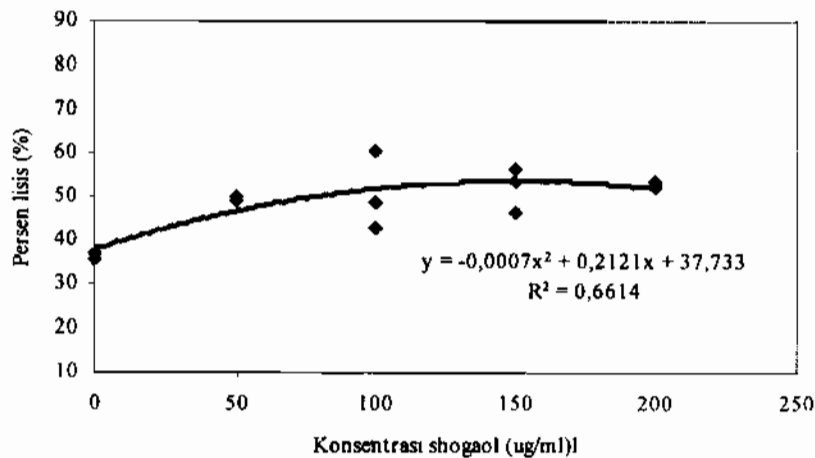


Gambar 4. Kurva respons sitolitik sel NK pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:100 dalam kondisi tanpa stres oksidatif

a) ST : SE = 1 : 50



b) ST : SE = 1 : 100



Gambar 6. Kurva respons sitolitik sel NK dalam biakan sel dengan nisbah a) ST:SE=1:50, b) ST:SE = 1: 100 kondisi stres oksidatif terhadap penambahan shogaol

KESIMPULAN

Senyawa oleoresin jahe, termasuk gingerol dan shogaol memiliki kemampuan imunomodulasi karena mampu meningkatkan respons sitolitik sel NK. Senyawa aktif jahe tertentu pada kondisi tertentu meningkatkan kemampuan lisis sel NK terhadap sel target K-562 yang dibiakkan secara *in vitro*.

Pada kondisi tanpa stres, senyawa oleoresin, gingerol, dan shogaol jahe meningkatkan kemampuan lisis sel NK terhadap sel target K-562 baik pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:50, dan ST:SE=1:100. Peningkatan tertinggi terjadi pada penambahan oleoresin dan gingerol pada konsentrasi rendah (50 µg/mL). Sebaliknya, shogaol mampu meningkatkan respons sitolitik sel NK pada konsentrasi tinggi (150 dan 200 µg/mL), namun pengaruhnya tidak nyata.

Pada kondisi stres oksidatif, dan biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:50 ketiga senyawa aktif jahe meningkatkan respons sitolitik sel NK. Tetapi pengaruh peningkatan respons sitolitik sel NK akibat penambahan oleoresin dan gingerol tidak nyata. Senyawa shogaol secara nyata meningkatkan respons sitolitik sel NK. Pada biakan sel dengan nisbah ST:SE=1:100, gingerol secara nyata meningkatkan respons sitolitik sel NK, sebaliknya shogaol secara nyata menurunkannya. Semakin tinggi konsentrasi senyawa shogaol, semakin rendah respons sitolitik sel NK, bahkan lebih rendah dari biakan sel kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Khayat, M.A. and G. Blank.** 1985. Phenolic spice components sporostatics to *B. subtilis*. *J. Food Sci.* 50:971-974.
- Chen, C., C.K. May and C.T. Ho.** 1986. High performance liquid chromatographic determination of pungent gingerol compound of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) *J. of Food Sci.* 51 (12): 1364-1365.
- Cillard, J., P. Cillard and M. Cormier.** 1980. Effects of experimental factors on the prooxidant behavior of tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57:255-261.
- Farrel, K.T.** 1985. Spices, condiments and seasoning. Avi. Publ. Co. Inc., Westport, Connecticut, USA.
- Gordon, M. H.** 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In Hudson, B. J. F. (ed.) Food antioxidants. Elsevier Applied Science. London.
- Haaland, P.D.** 1989. Experimental Design in Biotechnology. Marcel Dekker Inc. New York.
- Hikino, H., Y. Kiso, N. Kato, Y. Humada, T. Shioiri, R. Aiyama, H. Itokawa, F. Kiuchi and U. Sankawa.** 1985. Antihepatotoxic actions of gingerols and diarylheptanoids. *J. Ethnopharmacol.* 14 : 31-39.
- Hudson, B.J.F. (ed.).** 1990. Food Antioxidants. Elsevier. Applied Science, New York.
- Kartikawati, D.** 1999. Studi efek protektif vitamin C dan E terhadap respon imun dan enzim antioksidan mencit yang dipapar paraquat. Tesis-FPS, IPB.
- Keys, J.D.** 1981. Chinese herbs : their botany, chemistry and Pharmacodynamics. Charles E. Tuttle Company Tokyo, Japan. pp. 77-78
- Kikuzaki, H. and N. Nakatani.** 1993. Antioxidant effect of some ginger constituents. *J. Food Sci.* 58 : 1407-1410.
- Kleinsmith, L.J. and V.M. Kish.** 1995. Principles of cell and molecular biology. Harpercollins College Publishers. New York.
- Kuby, J.** 1992. Immunology. W.H. Freeman and Company. New York.
- Lienni, K.** 1991. Pengaruh sari jahe (*Zingiber officinale Roscoe*) terhadap aktivitas pertumbuhan beberapa bakteri penyebab infeksi maknan. Tesis Pascasarjana IPB. Bogor.
- Lucas, R.** 1979. Secrets of the Chinese Herbalists. Corner Stone Library. New York. pp. 28-29.
- Mead, R., R.N. Curnow and A.M. Hasted.** 1993. Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology. Chapman & Hall, New York.
- Nakatani, N.** 1993. Natural antioxidant from spices. In Huang, M.T., C.T. Ho and C. Y. Lee., 1993. Phenolic compounds in food and their effects on health II. ACS Symposium Series 507. American Chemical Society, Washington, D.C
- Nurrahman.** 1998. Pengaruh konsumsi sari jahe terhadap kadar MDA sel, sel CD3+ pada mahasiswa pesantren Ulil Albab, Kedung Badak, Bogor Tesis. Pascasarjana IPB, Bogor.
- Paimin, F.B. dan Murhananto.** 1991. Budidaya, pengolahan dan perdagangan jahe. Penebar swadaya, Jakarta.
- Prangdimurti, E.** 1999. Mempelajari efek perlindungan ekstrak jahe terhadap respon imun mencit yang diberi perlakuan pestisida parakuat. Tesis. Pascasarjana IPB.
- Rismunandar.** 1988. Rempah-rempah Komoditi Ekspor Indonesia. C.V. Sinar Baru, Bandung.
- Roitt, I.M.** 1991. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publication, London.
- Rose, N.R., E.C. de Macario, J.L. Fahey, H. Friedman and G.M. Penn.** 1994. Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Sastroamidjoyo, S.** 1988. Obat asli Indonesia. Dian Rakyat Jakarta.
- Sherman, A.R. dan J.F. Lockwood.** 1987. Impaired natural killer cell activity in iron-deficiency rat. *J. Nutr. Immunol.* 117 : 567-571.
- Shoji, N., A. Iwasa, T. Takemoto, Y. Ishida and Y. Ohizumi.** 1982. Cardiotonic principle of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *J. Pharm. Sci.* 71 : 1174-1175.
- Subarnas, A. dan Sidik.** 1997. Peranan dan khasiat rempah-rempah dalam jamu. Di dalam Prosiding Seminar Pusat Kajian Makanan Tradisional, PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Suekawa, M.A., K. Ishige, K. Yuasa, M. Sudo, M. Aburada dan E. Hosoya.** 1984. Pharmacological studies on ginger I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J. Pharmacobiodyn* 7 : 836-848
- Steel, R.G.D. and J. H. Torrie.** 1980. Principles and Procedures of Statistics McGraw-Hill, Inc. New York.