Synthesis Of Octenyl Succinate Anhydride Esterified Porang (Amorphophallus oncophyllus) Glucomannan
and Its Immunostimulatory Activity On Macrophages
SELLEN GURUSMATIKA, Prof. Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc ; Prof. Dr. Yudi Pranoto, S.TP, MP ; Prof. Takuya Sugah
Universitas Gadjah Mada, 2017 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

SYNTHESIS OF OCTENYL SUCCINATE ANHYDRIDE ESTERIFIED PORANG (*Amorphophallus oncophyllus*) GLUCOMANNAN AND ITS IMMUNOSTIMULATORY ACTIVITY ON MACROPHAGES

ABSTRACT

Porang tuber (*Amorphophallus oncophyllus*) is one of potential glucomannan sources in Indonesia due to its high-level glucomannan content. Esterification of glucomannan with octenyl succinate anhydride (OSA) produces a polymeric surfactant that has a high potential to be used as an emulsion stabilizer in foods. Glucomannan is more popularly known as healthy food due to high level fiber content. Esterified glucomannan can be synthesized via chemical modification using OSA. Therefore, in this study synthesis of OSA-PG (porang glucomannan) and its immunostimulatory effect on mouse macrophage-like J774.1 cells and mouse primary peritoneal macrophages (P-mac) were investigated.

Various sample of OSA-PG were prepared from 1%, 2% and 3% of OSA solutions by esterification method under the alkalescent condition. In order to evaluate the effectiveness of OSA group attachment into porang glucomannan molecules, functional group using Fourier Transform Infrared (FTIR) assay, oil holding capacity (OHC), and emulsion capacities were done. Selected OSA-PG was used to study the immunostimulatory activity of macrophage. For immunostimulatory, study selected sample was prepared by dilution with water for 15 h at 4^{o}C. Sample solution was used for phagocytosis activity, cytokine production, and gene expression level using mouse macrophage-like J774.1 cells and P-mac. Furthermore, immunoblot analysis was done to evaluate underlying mechanism of OSA-PG activation on macrophage. In this study the effect of OSA-PG on cytokine production in the presence of TLR4 inhibitor, mannanase and endotoxin was evaluated.

In the present study, FTIR assay showed that the OSA groups had been grafted into glucomannan, it was characterized by C=O group stretching. Sample OSA-PG 3% had the best OHC score than other samples. OSA-PG had higher emulsifying capacity (94%) than native PG (20%). The result of immunostimulatory study from selected sample OSA-PG 3% showed that OSA-PG had immunostimulatory activity by enhancing phagocytosis activity of macrophages and increased the production of IL-6 and TNF-α as well as their genes expression level both J774.1 cells and peritoneal macrophage. Immunoblot analysis showed that OSA-PG activates NF-κB and MAPK cascades. Our findings also indicated that OSA-PG activated macrophage through not only TLR4, but also from other receptors. Furthermore, examination by polymyxin B showed that cytokines production induced by OSA-PG was not the result of endotoxin contamination. The enhancement of IL-6 and TNF-α production by mannanase treated OSA-PG may be related to the presence of a mannose receptor involved in phagocytosis. Overall findings suggests that OSA-PG was potentially used as emulsifier for using in food additive with immunostimulatory activity through the stimulation of macrophages by increasing phagocytosis activity, enhancing cytokine production and gene expression level.

Keywords: Porang glucomannan; octenyl succinate anhydride (OSA); immunostimulatory; macrophages.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Synthesis Of Octenyl Succinate Anhydride Esterified Porang (Amorphophallus oncophyllus) Glucomannan
and Its Immunostimulatory Activity On Macrophages**
SELLEN GURUSMATIKA, Prof. Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc ; Prof. Dr. Yudi Pranoto, S.TP, MP ; Prof. Takuya Sugah
Universitas Gadjah Mada, 2017 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

SINTESIS DARI ESTERIFIKASI PORANG (*Amorphophallus oncophyllus*) GLUKOMANAN DENGAN OKTENIL SUKSINAT ANHIDRAT DAN AKTIVITAS IMUNOSTIMULATORI PADA MAKROFAG

INTISARI

Umbi porang (*Amorphophallus oncophyllus*) adalah salah satu sumber potensial penghasil glukomanan yang ada di Indonesia. Esterifikasi glukomanan dengan oktenil suksinat anhidrat (OSA) menghasilkan sebuah polimer surfaktan yang berpotensi sebagai pengemulsi dalam pangan. Glukomanan lebih dikenal sebagai makanan kesehatan karena kandungan serat pangannya. Glukomanan tersesterifikasi dapat disintesis secara modifikasi kimia menggunakan reagen OSA. Oleh karena itu, pada penelitian ini sintesis dan pengaruh imunomodulasi dari OSA-PG (porang glukomanan) pada makrofag J774.1 dan makrofag peritoneal dari tikus (P-mac) telah dipelajari.

OSA-PG dipersiapkan dengan variasi jumlah larutan OSA dari 1%, 2% dan 3% secara metode esterifikasi dalam kondisi basa. Keefektifan dari esterifikasi pada porang glukomanan dianalisa menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) spektro, *Oil Holding* Capacity (OHC) dan kemampuan emulsi. Kemudian, sampel OSA-PG yang terpilih digunakan untuk pengujian aktivitas imunostimulatori pada makrofag. Pada pengujian pengaruh imunostimulatori, sample OSA-PG dipersiapkan dengan dilarutkan pada destilasi air dan di ekstrak selama 15 jam pada suhu 4ºC. kemudian sampel digunakan untuk menstimulasi aktivitas fagositosis, produksi sitokin, dan ekspresi gen menggunakan makrofag J774.1 dan makrofag peritoneal dari tikus (P-mac). Analisis imunoblot dilakukan untuk mengevaluasi mekanisme aktivasi OSA-PG pada makrofag. Selain itu, evaluasi TLR4 inhibitor, enzim mananase dan polimixin B juga dilakukan untuk mengetahui apakah penghambatan TLR4 inhibitor, treatment dengan enzim dan dugaan kontaminasi dari endotoxin berpengaruh terhadap produksi sitokin pada stimulasi OSA-PG terhadap aktivitas imunostimulatori.

Hasil analisa FTIR menggambarkan bahwa gugus OSA telah terikat pada molekul glukomanan yang ditandai adanya perbedaan *stretching* gugus C=O. Pada OSA-PG 3% memiliki kemampuan OHC yang terbaik dibandingkan dengan sampel lainnya. Kemampuan emulsi dari OSA-PG lebih tinggi yaitu mencapai 94% dibandingkan dengan native PG yang hanya sebesar 20%. Kemudian sample yang terpilih yaitu OSA-PG 3% juga terbukti memiliki aktivitas imunostimulatori untuk meningkatkan aktivitas fagositosis dari makrofag dan menstimulasi produksi IL-6 dan TNF-α serta didukung juga dengan peningkatan ekspresi gen dari IL-6 dan TNF-α dari makrofag J774.1 dan makrofag peritoneal (P-mac). Analisis imunoblot menunjukkan bahwa OSA-PG mengaktifkan makrofag melalui jalur sinyal NF-κB dan MAPK. Selanjutnya pengujian dengan TLR4 inhibitor mengindikasikan bahwa OSA-PG mengaktifkan makrofag tidak hanya melalui TLR4 reseptor. Pengujian dengan polimixin B menunjukkan bahwa produksi sitokin yang diinduksi oleh OSA-PG tidak terkontaminasi oleh endotoxin. Keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa OSA-PG memiliki potensi sebagai emulsifier dalam bahan pangan yang memiliki efek imunostimulatori melalui stimulasi makrofag yang ditandai adanya peningkatan aktivitas fagositosis, stimulasi produksi sitokin dan level ekspresi gen.

Kata kunci: Porang glukomanan; oktenil suksinat anhidrat (OSA); imunostimulatori; makrofag.