

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea* Lamk.) TERHADAP PENINGKATAN AKTIVITAS DAN KAPASITAS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG

Kusmardi¹, Shirly Kumala², Dwitia Wulandari²

1. Departemen Patologi Anatomik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

2. Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta 12640, Indonesia

E-mail: kusmardis@yahoo.com

Abstrak

Daun Johar (DJ) (*Cassia siamea* Lamk.) telah dilaporkan memiliki potensi untuk merangsang respon imun. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol DJ terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag. Duapuluh empat ekor mencit Swiss dibagi ke dalam 6 kelompok. Kelompok kontrol pertama (Group I) mendapatkan akuades, kontrol kedua (group II) mendapatkan CMC Na 0,5%, kontrol ketiga (group III) mendapatkan phytohemaglutinin. Sedangkan kelompok perlakuan: group IV mendapatkan 23,78 mg ekstrak etanol DJ/20 g BB, group V 47,56 mg/20 BB dan dan group VI 95,13 mg/20 g BB. Ekstrak diberikan sejak hari pertama hingga ketujuh. Pada hari kedelapan, kepada masing-masing mencit diinjeksikan intraperitoneal bakteri *Staphylococcus aureus* (SA). Aktivitas dan kapasitas sel makrofag dihitung dari sediaan apus cairan peritonium dengan menghitung persentase fagosit yang melakukan fagositosis dari 100 fagosit. Kapasitas fagositosis ditetapkan berdasarkan jumlah SA yang difagositosis oleh 50 fagosit aktif. Aktivitas fagositosis meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol DJ. Aktivitas dan kapasitas tertinggi dicapai oleh dosis ekstrak etanol DJ tertinggi dan kontrol positif PHA. Sedangkan aktivitas dan kapasitas terendah adalah kelompok akuades (369,5±18,1384) diikuti oleh kelompok CMC Na 0,5% (378,5±13,1783), kelompok EEDJ dosis 23,78 mg/20gBB (466,75±9,4296), dosis 47,56 mg/20 g BB (557±30,2324).

Abstract

The Effect of Ethanol Extract of Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) on the Macrophages Activities and Capacityes. Daun Johar (DJ) (*Cassia siamea* Lamk.) has already been reported to stimulate the immune response. The current study investigates the role of DJ on mice macrophages activities and capacityes. Twenty four Swiss mice were divided into 6 equal groups. The first control group (Group I), received aquadest. The second control group (Group II), was given CMC Na 0,5% . The third control group (Group III), was given phytohemaglutinin. The case group: group IV received 23,78 mg ethanol extract of DJ/20 g BW, group V received 47,56 mg/20 BW, and group VI received 95,13 mg/20 g BW. These were injected orally on day 1 until 7. On day 8, *Staphylococcus aureus* (SA) were injected intraperitoneally. The macrophages activities and capacityes were counted on slide smears of mice peritoneal fluid. According to enhancement of dose, either the macrophages activities or capacityes were found. The lowest activity encounter on the negative control (369,5±18,1384) followed by CMC Na 0,5% (378,5±13,1783), doses of 23,78 mg/20gBW (466,75±9,4296), doses of 47,56 mg/20 g BW (557±30,2324), positive control/PHA (670,5±10,0830) and doses of 95,13 mg/20 g BW (683,5±12,1244).

Keywords: macrophage, daun johar, Cassia siamea, mice

1. Pendahuluan

Pertumbuhan jaringan kanker dan mikroorganisme patogen erat kaitannya dengan lemahnya *immunologic surveillance* yang dilakukan oleh sistem imun baik selular maupun humoral¹⁻⁴. Peningkatan aktivitas sistem imun sekarang ini berkembang ke arah

penggunaan bahan alam sebagai imunostimulator. Maka, menurut kaidah keilmuan yang berlaku, segala informasi yang berhubungan dengan kandungan senyawa aktif dan mekanisme kerjanya yang terkandung dalam bahan alam menjadi sangat penting dalam upaya penapisan bahan alam sebagai imunostimulator⁵⁻⁶.

Salah satu petanda terjadinya peningkatan *immunologic surveillance*, adalah peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. Makrofag merupakan salah satu sel yang berperan penting dalam respon imun, baik berperan fungsional dalam fagositosis maupun perannya sebagai *antigen presenting cells* (APC)¹⁻⁴. Dalam melakukan kedua peran tersebut, bantuan mediator endogen seperti sitokin, sudah pasti dibutuhkan. Sedangkan kebutuhan akan mediator eksogen seperti karoten dan flavonoid, masih perlu penelitian mendalam.

Flavonoid, seperti halnya karotenoid, menurut penelitian yang telah ada, berpotensi sebagai antioksidan pada pertumbuhan tumor serta dengan sedikit penelitian terbukti meningkatkan respon imun walaupun masih banyak kontroversi yang dijumpai. Kontroversi ini terjadi karena mekanisme aktivasinya belum dapat dijelaskan^{7,8}.

Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.), dilaporkan banyak digunakan dalam pengobatan tradisional antara lain sebagai obat malaria, gatal, kudis, kencing manis, demam, luka dan dimanfaatkan sebagai tonik karena memiliki kandungan flavonoid dan karotenoid yang cukup tinggi^{9,10}.

Pada penelitian ini digunakan ekstrak etanol daun Johar (EEDJ) untuk melihat aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag dengan menggunakan mencit sebagai hewan coba secara *in vivo*. Selain itu penelitian ini juga untuk mengetahui toksisitas EEDJ, di mana uji toksisitas tersebut meliputi juga uji toksisitas akut (LD₅₀). Uji toksisitas sangat berhubungan dengan dosis aman yang akan digunakan dalam pemberian EEDJ terhadap peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag¹¹⁻¹⁴.

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan gambaran berharga kepada masyarakat tentang batas keamanan EEDJ, sehingga dapat dijadikan acuan untuk penggunaan selanjutnya dalam pemanfaatan daun Johar sebagai obat.

2. Metode Penelitian

Hewan coba. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Swiss berumur 4-6 bulan, berat badan 20-25 g. Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, semua mencit dipelihara terlebih dahulu selama kurang lebih satu minggu untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan dan berat badan serta menyeragamkan makanannya.

Pembuatan Ekstrak. Serbuk kering dari daun Johar dimaserasi dengan 10 bagian pelarut etanol 70%, dikocok selama 2 jam, kemudian diendapkan 24 jam, disaring, sehingga diperoleh filtrat pertama dan ampas.

Ampas dilarutkan kembali dengan pelarut etanol 70%, dikocok lagi selama 2 jam, didiamkan selama 1 jam dan disaring sehingga diperoleh filtrat kedua dan ampas. Kedua filtrat digabung dan dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 40-50° C hingga diperoleh ekstrak kental.

Penetapan LD₅₀. Uji toksisitas akut (LD₅₀) ekstrak etanol daun Johar (EEDJ) dilakukan dengan metode Weil C.S, dengan menggunakan mencit jantan sebagai hewan percobaan melalui jalur pemberian intraperitoneal. Perhitungan nilai LD₅₀ dilakukan dengan menggunakan tabel biometric dari Weil C.S¹¹.

Kultur *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* (SA) dibiak pada nutrien agar (NA) miring. Dari satu ose kultur SA diinokulasi ke dalam media NA miring setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. SA yang tumbuh pada media NA miring dipindahkan ke dalam kaldu pepton, diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. SA disentrifugasi 5000 rpm selama 15 menit lalu terbentuk pelet dan diresuspensikan setara dengan kekeruhan larutan McFarland 0,5^{15,16}.

Pemberian EEDJ. Mencit dibagi ke dalam 6 kelompok, yaitu kelompok pemberian EEDJ dengan dosis 10% (23,78 mg/20 g BB), 20% (47,56 mg/20 BB) dan 40% (95,13 mg/20 g BB) dari nilai LD₅₀, kontrol positif phytohaemagutinin (PHA), kontrol negatif CMC Na 0,5% dan kontrol normal aquadest. Volume ekstrak yang diberikan 0,1 ml. Masing-masing kelompok dicobakan pada 4 ekor mencit. Pada hari pertama hingga ke tujuh, mencit dicekok per oral.

Analisis Fagositosis Makrofag. Pada hari ke 8, mencit pada masing-masing kelompok diinfeksi dengan SA dan disuntikkan intra peritoneal (IP) 0,5 ml NaCl 0,9%, kemudian dibiarkan selama 1 jam. Mencit dieutanasi dan dibedah kemudian ditambahkan heparin pada cairan peritonium. Cairan peritoneum diambil dengan menggunakan sempit 1 ml. Cairan peritoneum tersebut dibuat preparat apus dan difiksasi dengan metanol absolut selama 5 menit, diwarnai dengan Giemsa, didiamkan selama 20 menit, dibilas dengan air dan dikeringkan. Preparat dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag dihitung. Aktivitas fagositosis ditetapkan berdasarkan persentase fagosit yang melakukan fagositosis dari 100 fagosit. Kapasitas fagositosis ditetapkan berdasarkan jumlah SA yang difagositosis oleh 50 fagosit aktif^{17,18}.

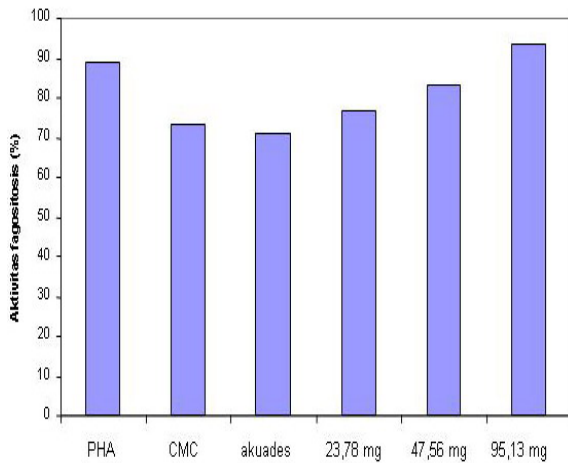
Analisis Data. Untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh EDKC dari berbagai dosis terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag digunakan uji ANOVA satu arah yang dilanjutkan dengan uji BNT (Tukey HSD).

3. Hasil dan Pembahasan

Aktivitas makrofag. Aktivitas fagositosis sel makrofag peritoneum mencit dapat dilihat pada Gambar 1. Aktivitas makrofag paling rendah terjadi pada kontrol akuades, diikuti kelompok kontrol CMC. Aktivitas meningkat seiring dengan peningkatan dosis EEDJ. Aktivitas tertinggi dicapai oleh dosis EEDJ tertinggi dan kontrol positif PHA.

Hasil yang diperoleh dari analisis uji beda nyata terkecil Tukey HSD ditunjukkan oleh Gambar 2.

Dari Gambar tersebut terlihat bahwa antara kelompok kontrol akuades dan kontrol CMC tidak berbeda. Masing-masing dosis menunjukkan kapasitas fagositosis yang berbeda. Makin tinggi dosis pemberian EEDJ, makin tinggi pula kapasitasnya, bahkan kapasitas dosis 95,13 mg/20 g BB melebihi kapasitas fagositosis makrofag yang ditambah PHA.



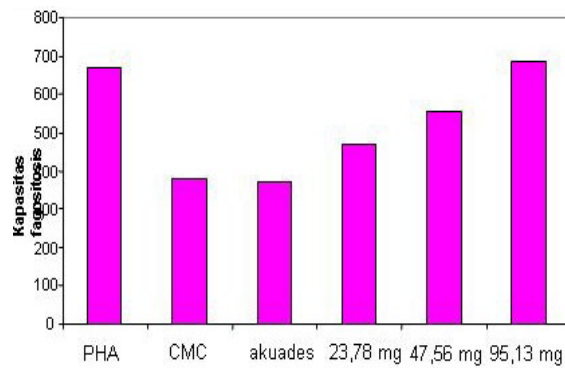
Gambar 2. Persentase aktivitas fagositosis sel makrofag pada cairan peritoneum mencit

Dosis	N	Substet for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Tukey # Kontrol - Aquadest	4	71.00				
Kontrol - CMC Na	4	73.25				
Dosis 23.78 mg	4		77.00			
Dosis 47.56 mg	4			83.25		
Kontrol + PHA	4				89.00	
Dosis 95.13 mg	4					93.50
Sig.		.390	1.000	1.000	1.000	1.000

Gambar 2. Uji Tukey HSD aktivitas fagositosis makrofag berbagai kelompok

Dosis	N	Substet for alpha = .05			
		1	2	3	4
Tukey HSD # Kontrol - Aquadest	4	369.50			
Kontrol - CMC Na	4	378.50			
Dosis 23.78 mg/20g bb	4		466.75		
Dosis 47.56 mg/20 g bb	4			557.00	
Kontrol + PHA	4				670.50
Dosis 95.13 mg/20 g bb	4				683.50
Sig.		.973	1.000	1.000	.885

Gambar 3. Uji Tukey HSD kapasitas fagositosis makrofag berbagai kelompok.



Gambar 4. Kapasitas fagositosis sel makrofag pada cairan peritoneum mencit

Kapasitas fagositosis. Dari Gambar 3 dan Gambar 4 terlihat bahwa kapasitas fagositosis terendah adalah kelompok kontrol akuades (369,5±18,1384) diikuti kelompok kontrol negatif CMC Na 0,5% (378,5±13,1783), kelompok EEDJ dosis 23,78 mg/20gBB (466,75±9,4296), dosis 47,56 mg/20 g BB (557±30,2324), kelompok kontrol positif PHA (670,5±10,0830) dan dosis 95,13 mg/20 g BB (683,5±12,1244).

Hasil yang diperoleh dari analisis uji beda nyata terkecil Tukey HSD pada Gambar 3.

Penelitian awal ditujukan untuk mengetahui nilai LD₅₀ dari EEDJ, dengan pemberian secara intraperitoneal. Pada penelitian uji toksisitas EEDJ LD₅₀ 23,78 mg/20 g BB sama dengan 1189,10 mg/kg BB, rentangnya 12,63-44,77 mg/20 g BB sama dengan 631,56-2238,82 mg/kg BB. Dengan demikian, EEDJ termasuk dalam klasifikasi toksisitas sedang. Dosis ekstrak EEDJ yang digunakan pada penelitian dalam mengamati respon fagositosis sel makrofag adalah 10 %, 20 % dan 40 % dari LD₅₀ yang diperoleh dengan pemberian secara oral. Oleh sebab itu diperoleh tingkatan dosis 23,78 mg/20 g BB, 47,56 mg/20 g BB dan 95,13 mg/20 g BB¹¹⁻¹⁴.

Penelitian selanjutnya adalah pengamatan aktivitas makrofag. Aktivitas makrofag paling rendah dijumpai pada kelompok kontrol akuades, diikuti oleh kelompok kontrol CMC. Aktivitas meningkat seiring dengan peningkatan dosis EEDJ. Aktivitas tertinggi dicapai oleh dosis EEDJ tertinggi dan kontrol positif PHA (Gambar 2). Peningkatan aktivitas makrofag seiring dengan tingginya dosis, menunjukkan bahwa terdapat bahan aktif yang terkandung dalam EEDJ yang berpotensi untuk meningkatkan aktifitas makrofag.

Secara statistik bahkan dibuktikan bahwa pada dosis tertinggi dalam penelitian ini, memiliki aktivitas lebih tinggi dibanding PHA sekalipun.

Telah diinformasikan sebelumnya, bahwa EEDJ mengandung flavonoid yang cukup tinggi. Pada penelitian bahan alam lain yang mengandung flavonoid, seperti meniran (*Phyllanthus niruri* L.) memiliki kemampuan dalam memperbaiki sistem imun⁵⁻¹⁰. Berarti, hasil penelitian ini sesuai dengan harapan, yakni hipotesis terbukti, dengan kata lain bahwa EEDJ memiliki potensi bekerja sebagai imunostimulan. Flavonoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis.

Hasil penelitian mengenai kapasitas makrofag, juga menunjukkan bahwa masing-masing dosis menunjukkan kapasitas fagositosis yang berbeda. Makin tinggi dosis pemberian EEDJ, makin tinggi pula kapasitasnya, bahkan kapasitas dosis 95,13 mg/20 g BB. Dengan jumlah bakteri yang tetap dari dosis terendah hingga dosis tertinggi, hasil ini menunjukkan bahwa memang betul terjadi peningkatan kapasitas makrofag selain peningkatan aktivitas makrofag yang telah diuraikan di atas. Berarti pula bahwa makin tinggi dosis, makin banyak sel bakteri yang difagosit oleh satu sel makrofag.

Sama dengan yang terjadi pada pengukuran aktivitas, pada dosis tertinggi ditunjukkan memiliki kemampuan kapasitas makrofag yang diberi PHA. Hal ini menunjukkan bahwa, dosis yang disarankan untuk digunakan sebagai imunostimulator adalah dosis tertinggi.

4. Kesimpulan

Nilai LD₅₀ dari EEDJ adalah 23,78 mg/20 g BB, Lamk. termasuk dalam klasifikasi toksisitas sedang. Pemberian EEDJ meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag. Dosis yang disarankan untuk digunakan sebagai imunostimulator adalah dosis tertinggi. Pada dosis tertinggi dalam penelitian ini, memiliki aktivitas lebih tinggi dibanding PHA sekalipun.

Daftar Acuan

1. Bellanti JA, Kadlec JV. Imunologi Umum. In: Imunologi III. Diterjemahkan oleh Wahab AS, Soeripto N. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 1993. hal. 1, 7-8,18.
2. Baratawidjaja KG. Imunologi Dasar. Edisi 6. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta; 2003. hal. 1-3,11-2,15,33-4.
3. Kresno SB. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta; 2001. hal. 4-5.
4. Komala I, Astrawinata DAW. Mekanisme Pertahanan Tubuh Manusia Pada Infeksi. Maj Kedok Indon; 1996. hal. 489-502.
5. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000. hal 9,10,11.
6. Safitri E. Studi Tentang Efek Imunostimulan Tilosin Terhadap Peningkatan Respon Kekebalan Nonspesifik [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. 2000. hal.34.
7. Soedibyo M. Alam Sumber Kesehatan., Cetakan I. Jakarta: Balai Pustaka; 1988. hal. 179-80.
8. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia, Edisi IV. Jakarta: Ditjen POM; 1985. hal. 7.
9. Heyne K. Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid II. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya; 1987. hal. 926-27.
10. Syamsuhidayat SS, dan Hutapea JR. Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1991. hal. 124-5.
11. Lu FC. Toksikologi dasar asas, organ sasaran, dan penelitian risiko. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Edi Nugroho. Jakarta : UI Press. 1995. hal. 85-93.
12. Loomis. Toksikologi dasar. Edisi 3. Alih Bahasa Donatus Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; 1978. hal. 20-27.
13. Harbone JB. Metode Fitokimia, Bandung; ITB; 1987. hal. 6-8.
14. Weil CS. Table for convenient calculation of median effective dose (LD₅₀) and instruction in their use biometrics. 1952
15. Brooks FG, dkk. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 20. Alih Bahasa. Nugroho, Edi dan Maulany, R.F. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; hal. 120, 211-2.
16. Hart T, Shears P. Atlas Berwarna Mikrobiologi Kedokteran. Cetakan I. Alih Bahasa. Pratama, E.F dan Kumala, Poppy. Jakarta: Penerbit Hipokrates; 1997. hal. 90.
17. Handojo I. Pengantar Imunoasai Dasar. Cetakan Pertama. Surabaya: Airlangga University Press; 2003. hal. 2-3.

18. Grieco MH, Meriney D K. Immunodiagnosis for Clinicians: Interpretation of Immunoassays.

Chicago: Year Book Medical Publishers, INC; 1985. hal. 227.