

**AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG
DARI FRAKSI N-HEKSAN HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*, (Burm.F) Nees)
TERHADAP MENCIT YANG DIINDUKSI VAKSIN HEPATITIS B**

**MACROFAG PHAGOCYTIC ACTIVITY OF N-HEXANE FRACTION OF ANDROGRAPHIS
HERBS (*Andrographis paniculata*, (Burm.F) Nees) IN MICE INDUCED BY HEPATITIS B
VACCINE**

Mamik Ponco Rahayu

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta
Jl. Letjen. Sutoyo, Mojosongo, Surakarta, Indonesia 57127
Email: pi_er@yahoo.co.id (Mamik Ponco Rahayu)

ABSTRAK

Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Burm. Nees) mengandung komponen senyawa kimia yang mempunyai aktivitas sebagai imunomodulator. salah satu kandungan zat aktifnya adalah andrographolida yang aktif sebagai hepatoprotektor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari *A. paniculata* sebagai imunomodulator terhadap mencit Balb/c yang telah diinduksi vaksin hepatitis B. Ekstraksi herba sambiloto menggunakan alat Soxhlet dengan pelarut yang berseri. Vaksin hepatitis B digunakan sebagai penginduksi mencit Balb/c. Sebagai tolak ukur imunostimulator adalah peningkatan aktivitas fagositosis makrofag. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tiga fraksi aktif dengan peningkatan aktifitas fagositosis makrofag tertinggi sampai terendah yaitu F2, F3, dan F1. Hasil analisis fitokimia menunjukkan kandungan golongan senyawa dari fraksi F1 adalah terpenoid, F2 adalah steroid, terpenoid, dan flavonoid; F3 dan F5 adalah terpenoid; serta fraksi F4 mengandung alkaloid.

Kata kunci: hepatitis B, herba sambiloto (*A. paniculata* Burm. Nees), imunomodulator, vaksin.

ABSTRACT

Andrographis herbs (Andrographis paniculata Burm. Nees) contains many active compounds and showed imunomodulatory activity. One of its component, andrograplide, has hepatoprotector activity. Therefore, the aim of this study was to find out the immunomodulator compounds from A. paniculata in the BALB/c mice induced by hepatitis B vaccine. Andrographis herbs was extracted using Soxhlet by series of solvents. The isolation process was guided by in vivo imunomodulatory activity in in Balb/c mice induced by hepatitis B vaccine. The imunostimulant activity was assesed through the phagocytic activity of macrophage. The most active extract was fractionated by vaccum column chromatography and further phytochemically identified. The fraction enhanced phagocyte activities of macrophage were F2, F3, and F1. The results of phytochemical

analysis showed that the group of compounds from F1 was terpenoid, F2 were steroid, terpenoid, and flavonoid; F3 and F5 were terpenoid; and F4 was alkaloid.

Key words: *andrographis herbs (Andrographis paniculata Burm. Nees), imunomodulator, hepatoprotector, hepatitis B vaccine.*

Pendahuluan

Indonesia adalah negara yang mempunyai *carrier* hepatitis B terbanyak nomor tiga setelah Cina dan India. Menurut WHO, Indonesia termasuk daerah hepatitis B yang endemis dengan tingkat penderita sedang dan berat. Penderita hepatitis B sebagian besar akan sembuh dengan baik dan hanya sebagian kecil saja yang langsung meninggal oleh ganasnya virus atau karena ketahanan tubuh yang rendah. Sepersepuluh kasus hepatitis B akan berkembang menjadi hepatitis menahun dan 20% penderita hepatitis kronik ini dalam waktu 25 tahun sejak tertular akan mengalami sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler. Sebagian pasien hepatitis B menahun, penyakitnya dapat menjadi tidak aktif lagi, namun sebagian lagi akan terus memburuk dalam hitungan tahun. Pasien dengan hepatitis menahun aktif inilah yang memikul risiko komplikasi, yaitu menjadi sirosis atau menjadi kanker hati. Kedua komplikasi ini umumnya berakhir dengan kematian (American Liver Foundation, 2006).

Pengobatan hepatitis B dapat melalui immunomodulator meliputi semua bahan yang memacu respon imun untuk menghancurkan sel hati yang

terinfeksi dengan virus hepatitis B dan membersihkan hati dari virus (American Liver Foundation, 2006). Ada 3 kemungkinan tanggapan kekebalan tubuh terhadap virus hepatitis B pasca periode akut. Pertama, jika tanggapan kekebalan tubuh lebih kuat, maka akan terjadi pembersihan virus, dan pasien sembuh. Kedua, jika tanggapan kekebalan tubuh lemah, maka pasien tersebut akan menjadi *carrier* inaktif. Ketiga, jika tanggapan tubuh bersifat *intermediate* (antara dua hal di atas) maka penyakit akan terus berkembang menjadi hepatitis B kronis.

Selama ini upaya pencegahan terhadap hepatitis B telah dilakukan dengan cara pemberian vaksin hepatitis B, namun Ediati *et al.* (2007) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa vaksin hepatitis B ini dapat menyebabkan berbagai reaksi yang berbalikan seperti adanya nekrosis pada pola histopatologinya, *sudden death infant syndrome* (SIDS), *mielitis*, *multiple sclerosis*, dan *optic neuritis*. Menurut pandangan sistem pengobatan tradisional obat-obat alam termasuk obat-obat nabati, dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan alamiah tubuh. Seiring dengan makin berkembangnya pemahaman mengenai respon imun

tubuh dalam menghadapi infeksi maupun penyakit lain, makin berkembang pula penelitian mengenai komponen yang dapat mempengaruhi respon imun tersebut.

Pemberian senyawa yang bersifat hepatoprotektif dan imunostimulan diduga dapat memperbaiki aktivitas dan mengurangi efek samping akibat pemberian vaksin hepatitis B. Ada beberapa obat tradisional yang memiliki kedua aktivitas tersebut, salah satunya adalah tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dengan kandungan aktifnya andrografolid. Senyawa andrografolid merupakan senyawa diterpen lakton, memiliki berbagai aktivitas seperti penghambatan pertumbuhan tumor melalui aktivasi limfosit T (Sheeja dan Kuttan, 2007). Kapil *et al.*, (1993) melaporkan andrografolid dan andrografisid bersifat hepatoprotektif terhadap karbon tetraklorida yang bersifat toksik pada hepar tikus secara *in vivo*. Ekstrak sambiloto dapat meningkatkan produksi IFN- γ dari mencit yang divaksinasi dengan *Salmonella typhimurium*.

Widyawaruyanti *et al.* (1999) melaporkan bahwa ekstrak non polar dan semi polar dari herba sambiloto

dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro* dengan sifat imunostimulan terhadap sekresi IFN- γ dan imunosupressan terhadap sekresi TNF- α . Senyawa murni andrografolid mempunyai aktivitas imunostimulan yang lebih rendah daripada ekstrak sambiloto, dimungkinkan ada senyawa-senyawa lain yang secara sinergis meningkatkan respon imun mencit terhadap antigen sel darah merah domba. Oleh karena itu dilakukan fraksinasi ekstrak sambiloto menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya sehingga dapat diketahui senyawa-senyawa aktif yang mempunyai aktifitas sebagai imunomodulator.

Vaksin hepatitis B sebagai antigen dapat menginduksi produksi antibodi anti-HBs yang memberikan imunitas terhadap hepatitis B. Produksi anti-HBs dapat ditingkatkan atau diturunkan oleh senyawa aktif yang terdapat dalam bahan alam. Dalam penelitian ini digunakan vaksin hepatitis B yang mengandung 5 µg/0,5 mL HbsAg karena lebih aman dibanding dengan virus hepatitis yang aktif. Makrofag juga berperan pada reaksi imunologis tubuh, dengan menelan, memproses, dan menyimpan antigen dan menyampaikan informasi kepada sel-sel berdekatan

secara imunologis kompeten (limfosit dan sel plasma). Makrofag mempunyai reseptor yang mengikat antibodi dan menghancurkan antigen yang khas terhadap antibodi itu sehingga perlu dilakukan pengamatan terhadap peningkatan aktivitas dan kapasitas makrofag.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/c, dengan pertimbangan mencit adalah binatang yang mempunyai respon imun yang baik (Mangkuwidjojo, 2003), dan galur Balb/c telah dikembangkan di Fakultas Farmasi UGM. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas senyawa-senyawa aktif imunomodulator yang diisolasi dari ekstrak sambiloto terhadap terhadap mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan utama: herba sambiloto diperoleh dari daerah Matesih, Karanganyar dan mencit Balb/c (umur kurang lebih 3 bulan, dengan berat badan kurang lebih 20 g diperoleh di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, UGM, Imboost® (imunostimulator); curcuma plus®

(hepatoprotektor). Bahan penyari: n-heksana, etil asetat, metanol. Bahan KLT: fase diam (silika gel GF₂₅₄); fase gerak (toluen, n-heksana, etil asetat, metanol, kloroform). Bahan untuk makrofag: media RPMI, pen-strep, fungizone, FBS, natrium bikarbonat, PBS, kloroform, metanol, cat Giemsa (Merck), sumuran *microplate*, *coverslip*, lateks (diameter 3,0 µm, polimer dari polistirena, Sigma).

Alat

Alat yang digunakan adalah kromatografi kolom vakum, mikroskop cahaya, timbangan Sartorius, *vacuum rotary evaporator*, cawan petri, inkubator CO₂ 5% 37 °C, gunting, pinset steril, spuit injeksi, haemositometer, sentrifugator, mesin vortex, *laminar air flow*, *plate 96 well*, kapiler berheparin, *eppendorf tube*, tip biru, tip kuning, alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium.

Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman dan identifikasi herba sambiloto

Tahap pertama penelitian ini adalah melakukan determinasi herba sambiloto untuk memantapkan kebenaran dan kemurnian sampel yang digunakan dalam penelitian. Dengan memperhatikan ciri-ciri morfologi yang ada dalam herba

sambiloto dengan menggunakan petunjuk pustaka dibuktikan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, B2P2TO2T Tawangmangu, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan bahan

Herba sambiloto diambil secara keseluruhan mulai dari bagian atas tanah sampai bunganya. Bagian untuk daun yang diambil berwarna hijau gelap, bebas dari penyakit ditandai dengan tidak adanya bercak-bercak hitam atau lubang. Pengambilan herba dilakukan pada sore hari.

3. Pengeringan dan penyerbukan

Bahan yang akan dikeringkan dicuci bersih di bawah air kran untuk menghilangkan kotoran dan cemaran, setelah itu dipotong-potong kemudian herba dikeringkan dengan dioven pada suhu 40 °C. Pengeringan dilakukan hingga diperoleh kadar air < 5%. Bahan yang sudah kering segera diserbak dengan mesin penyerbuk, serbuk yang didapat diayak dengan ayakan No. 40.

4. Pembuatan ekstrak herba sambiloto

Ekstrak sambiloto diperoleh dengan penyarian bertingkat menggunakan pelarut yang berbeda

polaritasnya dari n-heksana, etil asetat dan metanol secara soklet sesuai dengan prosedur dalam sediaan galenik (Sarker *et al.*, 2006).

5. Fraksinasi ekstrak sambiloto

Pemisahan senyawa-senyawa aktif dari ekstrak sambiloto dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom vakum (KKV). Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan sebagai fase geraknya pelarut organik dan campurannya dengan polaritas yang semakin meningkat. Prosedur pelaksanaan KLT dan KKV disesuaikan menurut Sarker *et al.* (2006). Hasil fraksinasi yang mempunyai profil KLT yang sama digabung dan ditandai sebagai fraksi untuk digunakan uji imunomodulator dengan uji aktivitas fagositosis sel makrofag.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, hasil pengukuran jumlah IgG dengan metode Elisa tak langsung, ekstrak n-heksana dibanding kontrol positif dan ekstrak yang lain mempunyai perbedaan yang signifikan. Tahap selanjutnya untuk mengetahui fraksi aktif dari ekstrak n-heksana dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom vakum. Sebelum dilakukan fraksinasi, ekstrak

n-heksana diperiksa profilnya dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ nm dan fase gerak berupa tunggal maupun campuran yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Fase diam yang digunakan untuk fraksinasi adalah silika gel F₂₅₄ tanpa gypsum seberat 40 g dimasukkan ke dalam kolom (20 cm x 5 cm) kemudian di atasnya ditaburkan ekstrak dalam bentuk serbuk. Elusi dilakukan secara gradien dimulai dari pelarut nonpolar sampai polar sehingga diharapkan senyawa dapat terpisah secara berurutan mulai dari yang nonpolar sampai polar. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana; n-heksana-etil asetat (9:1); n-heksana-etil asetat (8:2); n-heksana-etil asetat (7:3); n-heksana-etil asetat (6:4); n-heksana-etil asetat (5:5); n-heksana-etil asetat (4:6); etil asetat, etil asetat-metanol (9:1); etil asetat-metanol (8:2); etil asetat-metanol (7:3); etil asetat-metanol (6:4); etil asetat-metanol (5:5).

6. Persiapan hewan uji dan pengambilan sampel uji

Sejumlah 30 ekor mencit sehat umur ± 12 minggu berat ± 20 g dibagi menjadi 3 kelompok @ 5 ekor yaitu

kelompok I sebagai kelompok ekstrak yang dibagi menjadi 3 grup @5 ekor (ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat, ekstrak metanol); kelompok II @5 ekor sebagai kontrol positif imunostimulator (Imboost®), hepatoprotektor (curcuma plus®) dan kelompok III @5 ekor sebagai kontrol negatif (CMC 1%). Kelompok hewan uji diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum diberi vaksin hepatitis B, untuk kelompok hewan uji ekstrak dengan pemberian peroral dengan dosis 2,7 mg/20 g BB mencit Balb/c sekali sehari masing-masing kelompok. Setelah dikondisikan pada semua kelompok dilakukan vaksinasi I (dihitung sebagai hari ke-0 setelah 7 hari pengkondisian) dengan diberi vaksin hepatitis B yang dilakukan secara intraperitoneal. Vaksinasi kedua dilakukan pada hari ke-28, selama pemberian vaksin tetap diberi perlakuan yang sama pada masing-masing kelompok.

7. Uji aktivitas makrofag

a. Isolasi sel makrofag

Mencit yang sudah dibius dengan kloroform, diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol

70%. Mencit disuntikkan \pm 10 ml medium RPMI-1640 dingin ke dalam rongga peritoneum, tunggu \pm 3 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan sputis injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus dan disentrifus pada 1.200 rpm, 4 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 3 ml RPMI komplit (mengandung FBS 10%) pada pellet yang diperoleh. Jumlah sel yang didapat dihitung dengan menggunakan hemositometer, kemudian diresuspensi lagi dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ sel tiap sumuran maka dibagi menjadi 24 sumuran, volume tiap sumuran 200 μl , sehingga diresuspensi dengan media RPMI sebanyak 4800 μl , sebelum dimasukkan sumuran 200 μl penambahan *coverslip* dilakukan agar sel bisa

menempel dalam *coverslip*. Suspensi sel yang telah dihitung, diuji fagositosisnya dengan latex antigen dan masing-masing efektornya pada setiap sumuran *microplate* 24 yang telah diberi *coverslip* bulat, setiap sumuran 200 μl . Suspensi sel diinkubasi 37 °C, 30 menit dalam inkubator 5% CO₂. Kemudian ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml/sumuran dan diinkubasi lagi selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2x, kemudian ditambahkan medium komplit 1 ml/sumuran dan diinkubasi lagi selama 24 jam, kemudian dilakukan uji aktivitas fagositosis makrofag dengan metode lateks secara *in vitro*.

- b. Uji aktivitas fagositosis makrofag dengan metode lateks
- Uji kemampuan fagositosis non spesifik dilakukan dengan menggunakan *latex beads* diameter 3 μl . *Latex beads* diresuspensi dalam PBS sehingga didapat konsentrasi $2,5 \times 10^7/\text{ml}$. Diambil media dengan cara menyedot sehingga tinggal makrofag dalam *coverslip*. Masing-masing bahan uji ditambahkan dalam media RPMI 400 μl dengan

5 macam dosis, kontrol imunostimulator, dan kontrol air-tween, direplikasi sebanyak 3 kali, diinkubasi 4 jam. Kemudian ditambahkan 400 μ l suspensi lateks dalam PBS, diinkubasi dalam inkubator CO_2 selama 60 menit. Media diambil dengan cara menyedot dan dicuci dengan PBS 3x untuk menghilangkan lateks yang tidak terfagositosis. Selanjutnya dilakukan pengeringan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Metanol dituang dan ditunggu hingga kering, kemudian dicat dengan Giemsa 20% selama 30 menit dan dicuci dengan akuades kemudian diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu ruangan. Setiap 100 sel makrofag yang memfagositosis partikel *latex* dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Masing-masing konsentrasi yang diuji dilakukan replikasi tiga kali.

8. Identifikasi senyawa

Identifikasi senyawa yang aktif dilakukan dengan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄, fase gerak yang

sesuai, didukung dengan pereaksi pendekripsi.

1. Analisis data

Data yang diperoleh dievaluasi secara statistik yang melibatkan semua kelompok perlakuan. Metode statistik yang digunakan terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Jika data dinyatakan normal dan homogen maka digunakan uji ANOVA dilanjutkan uji LSD, jika hasil yang diperoleh sebaliknya maka digunakan analisis non-parametrik yaitu uji Kruskall Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil dan Pembahasan

Determinasi tanaman

Determinasi dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui nama ilmiah tumbuhan dan urutan klasifikasinya dan meyakinkan kebenaran tanaman yang diambil. Determinasi ini dilakukan di B2P2TO2T Tawangmangu, Karanganyar. Hasil determinasi adalah sebagai berikut:
1b_2b_3b_4b_12b_13b_14b_17b_18b_19b_20b_21b_22b_23b_24b_25b_25b_26b_27b_28b_29b_30b_31b_403b_404b_405b_414b_415b_451b_466b_467b_

468b_469b_470b_471a_472b_473b_478
b_479b_480b_481a _____ 187.

Acanthaceae 1b_36b_39b_40b_
42a_43a_44a **37. Andrographis** 1a

Andrographis paniculata (Burm.F) Ness.

Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia dari fraksi 1 sampai 5 menggunakan KLT dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ nm dan selulosa dengan berbagai macam eluen. Identifikasi yang dilakukan terhadap senyawa golongan metabolit sekunder dari *A. paniculata* meliputi terpenoid, steroid, flavonoid, dan alkaloid.

a. Identifikasi kandungan terpenoid

Senyawa terpenoid dapat dideteksi dengan pereaksi semprot vanillin asam-sulfat memberikan warna merah sampai biru (Sarker *et al.*, 2006; Wagner, 1984). Identifikasi kualitatif terpenoid dengan fase gerak toluen – etil asetat (93:7), sebagai pembanding digunakan *thymol*. Berdasarkan hasil identifikasi secara KLT terlihat senyawa *thymol* pada UV₂₅₄ menunjukkan peredaman, profil kandungan senyawa kimia dari masing-masing fraksi dapat dilihat pada Gambar 1, deteksi dengan UV₂₅₄ dan UV₃₆₅ nm terlihat komponen terbanyak ada di fraksi 3 kemudian

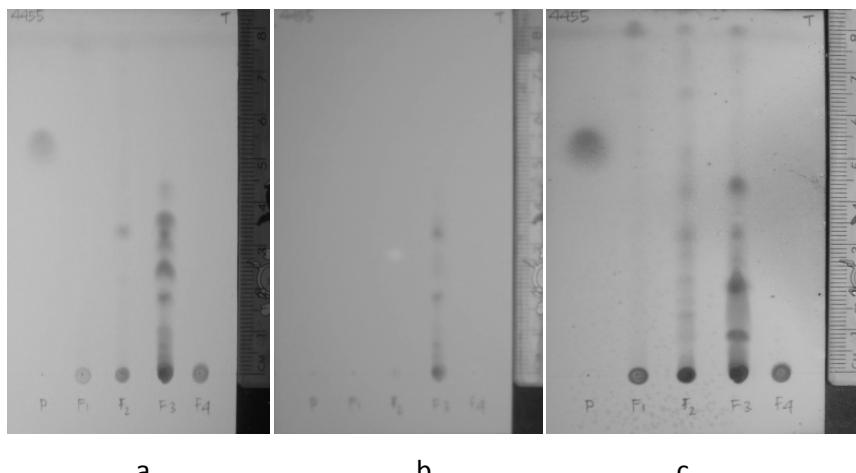
fraksi 2. Senyawa terpenoid bukan dan mungkin hanya memiliki sedikit gugus kromofor sehingga deteksi tidak dapat dilihat secara jelas dengan sinar visibel, UV₂₅₄ dan UV₃₆₅ nm. Setelah disemprot dengan vanillin asam sulfat dan dipanaskan, nampak fraksi 2 mempunyai jumlah bercak yang lebih banyak yaitu 4 bercak dengan Rf masing-masing 0,38; 0,52; 0,67 dan 0,78. Fraksi 3 ada 3 bercak dengan Rf masing-masing 0,11; 0,52; 0,94. Fraksi 1 hanya muncul 1 bercak dengan Rf 0,94. Warna spot setelah disemprot dengan vanillin asam sulfat sama dengan warna pembanding yaitu merah violet, sehingga dari hasil ini fraksi 1, 2, dan 3 mengandung senyawa terpenoid. Banyaknya spot yang sama dengan pembanding kemungkinan pada fraksi 2 dan 3 ada beberapa tipe terpenoid. Gambar 1 merupakan gambar kromatogram hasil identifikasi kualitatif golongan senyawa dari fraksi 5 dengan menggunakan pereaksi anisaldehid-asam sulfat pada suhu 110 °C. Tampak perubahan warna menjadi ungu kebiruan pada bercak setelah disemprot dengan pereaksi anisaldehid-asam sulfat.

b. Identifikasi kandungan steroid

Identifikasi kualitatif terhadap golongan senyawa steroid dengan fase gerak benzena – etil asetat (65:35) dan sebagai pembanding β -sitosterol (Stahl, 1969).

Profil kandungan senyawa kimia dari masing-masing fraksi dapat dilihat pada Gambar 3, deteksi dengan UV 254 dan 365 nm dengan reagen Lieberman Burchard sebagai penyemprot.

Perubahan warna terjadi setelah direaksikan dengan Lieberman Burchard, dari fraksi 1 sampai 4 menunjukkan warna spot yang sesuai dengan pembanding yaitu merah violet hanya fraksi 2. Berdasarkan kesamaan ini kemungkinan steroid terdeteksi hanya di fraksi 2 dengan Rf 0,76 dan 0,82.



Gambar 1. Identifikasi kualitatif terpenoid dengan sistem fase diam: silika gel GF₂₅₄ nm; fase gerak: toluena – etil asetat (93:7); deteksi: a) UV₂₅₄ b) UV₃₆₅ nm c). vanillin asam sulfat.

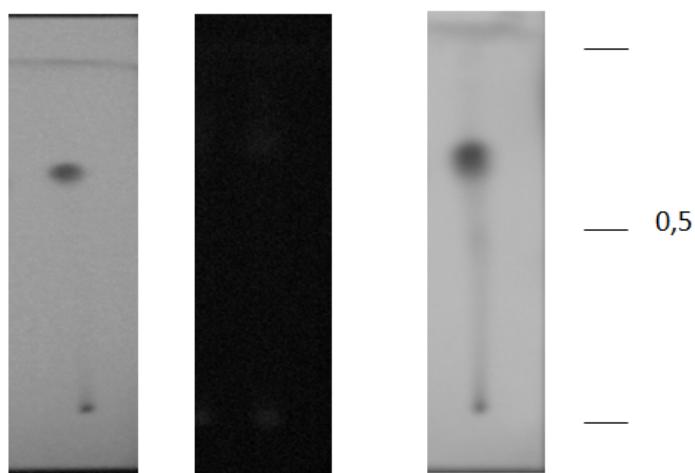
c. Identifikasi golongan flavonoid

Identifikasi kualitatif terhadap golongan senyawa flavonoid menggunakan dua macam fase diam yang pertama dengan selulosa dan

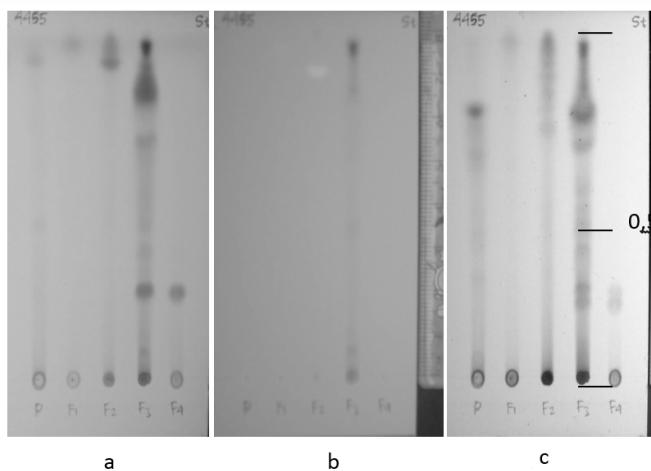
kedua silika gel. Hasil masing-masing kromatogram dapat dilihat pada Gambar 4. Deteksi adanya senyawa golongan flavonoid menurut Wagner (1984)

dengan reagen amoniak dan sitroborat. Berdasarkan hasil identifikasi terhadap golongan senyawa flavonoid diperkirakan hanya fraksi 2 yang mengandung flavonoid. Deteksi dengan UV 254 nm terjadi peredaman, UV 365

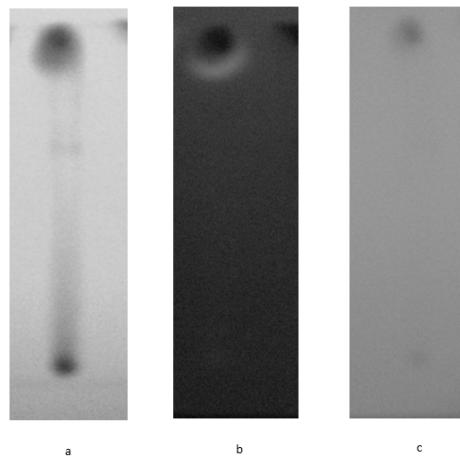
nm warna bercak kuning dan setelah diuapi amonia warna menjadi lebih kuning. Bercak terdeteksi hanya 1 dengan R_f 0,86. Total flavonoid setelah ditetapkan kadarnya dengan TLC scanner diperoleh 1,97%.



Gambar 2. Identifikasi kualitatif terpenoid terhadap fraksi 5 dengan sistem fase diam: silika gel GF₂₅₄ nm; fase gerak: toluena – etil asetat (93:7); deteksi: a) UV₂₅₄ b) UV₃₆₅ nm c) anisaldehida-H₂SO₄ (110 °C).



Gambar 3. Identifikasi kualitatif steroid dengan sistem fase diam: silika gel GF₂₅₄ nm; fase gerak: benzene:etil asetat (65:35); deteksi: a) UV₂₅₄ b) UV₃₆₅ nm c) Liebermann-Boucard.

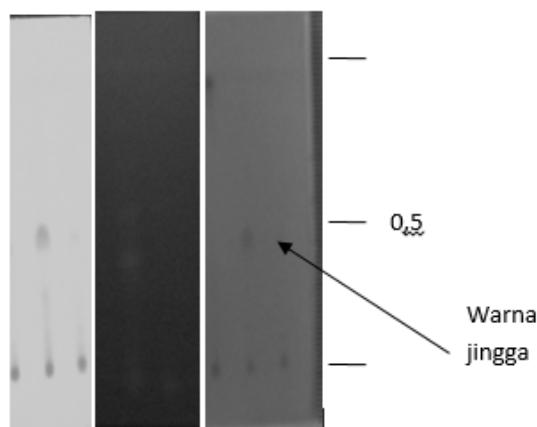


Gambar 4 . Identifikasi kualitatif flavonoid dengan sistem fase diam: silika gel GF₂₅₄ nm; Fase gerak: kloroform : etil asetat (1 : 1); deteksi a) UV₂₅₄ b) UV₃₆₅ nm c) sitroborat.

d. Deteksi golongan alkaloid

Identifikasi kualitatif golongan senyawa alkaloid dilakukan terhadap fraksi 4 dengan fase gerak kloroform : etil asetat (7:3) menggunakan Dragendorff sebagai penyemprot. Deteksi alkaloid dikatakan positif jika

setelah disemprot dengan Dragendorff nampak warna jingga atau kuning (Sarker *et al.*, 2006). Profil kandungan senyawa kimia dari fraksi 4 dapat dilihat pada Gambar 5. Fraksi 4 nampak warna jingga dengan Dragendorff, dimungkinkan ada kandungan alkaloid.



Gambar 5. Identifikasi kualitatif alkaloid dengan sistem fase diam: silika gel GF₂₅₄ nm; Fase gerak: kloroform : etil asetat (7:3); deteksi a) UV₂₅₄ b) UV₃₆₅ nm c) Dragendorff.

Tabel 1. Hasil identifikasi golongan senyawa pada fraksi

No	Fraksi	Identifikasi Golongan Senyawa			
		Terpenoid	Steroid	Flavonoid	Alkaloid
1	Fraksi 1	+	-	-	-
2	Fraksi 2	+	+	+	-
3	Fraksi 3	+	-	-	-
4	Fraksi 4	-	-	-	+
5	Fraksi 5	+	-	-	-

Keterangan : + = mengandung golongan senyawa
- = tidak mengandung golongan senyawa

Uji aktivitas imunostimulator terhadap fraksi

Uji aktivitas imunostimulator dilakukan pada 5 fraksi dari n-heksana dengan pemberian dosis pada masing-masing fraksi berbeda karena diperhitungkan berdasarkan rendemen yang dihasilkan dari proses fraksinasi terhadap dosis awal pemberian ekstrak. Semakin banyak ekstrak yang terfraksinasi maka pemberian dosis juga akan semakin besar, sehingga dari sini dapat diketahui juga komponen yang dapat memberikan aktivitas.

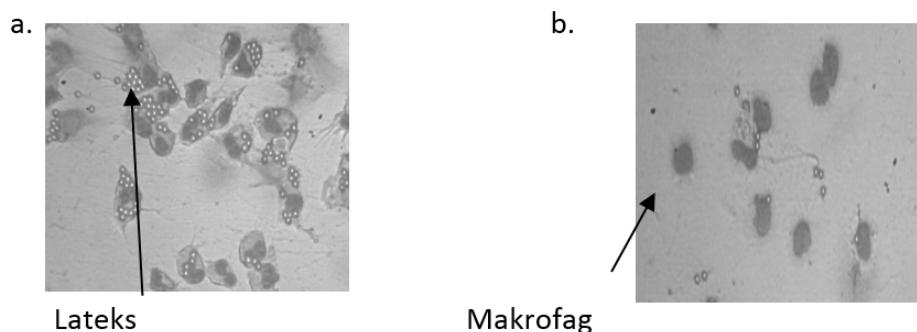
Uji aktivitas fagositosis sel makrofag terhadap fraksi n-heksana

Uji kemampuan fagositosis makrofag yang distimulasi oleh pemberian fraksi dilakukan dengan menggunakan lateks sebagai bahan uji. Lateks merupakan makromolekul yang dianggap benda asing yang sangat direspons baik oleh mencit maupun manusia dan memiliki ukuran seperti bakteri. Dengan adanya lateks akan

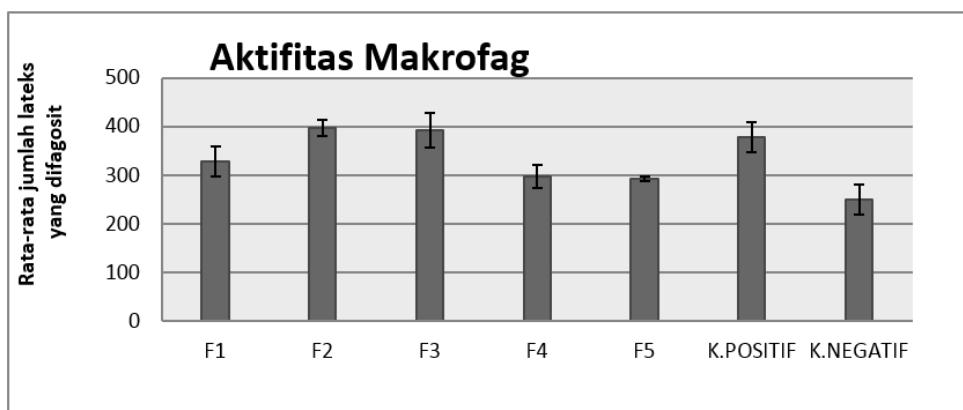
memacu aktifitas makrofag yaitu dengan memfagositosinya. Kemampuan sel makrofag untuk menempel pada *coverslips* membedakannya dengan sel-sel lainnya. Pengecatan dengan Giemsa akan memberikan warna pada makrofag sehingga makrofag tampak berwarna keunguan sedangkan lateks tidak akan berwarna, sehingga dapat digunakan untuk membedakan antara lateks yang terfagositosis dan yang tidak terfagositosis. Kemampuan fagositosis sel makrofag diukur dengan cara menghitung peningkatan jumlah partikel lateks intra-sel.

Gambar 6 menunjukkan adanya perbedaan aktivitas fagositosis lateks oleh sel makrofag antara kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok negatif. Gambar 6a terlihat adanya sel-sel makrofag yang lebih banyak memfagositosis lateks dengan membentuk pseudopodia dan fagosome

dibandingkan gambar 6b tidak memfagosit lateks.



Gambar 6. (a) Kultur sel makrofag dengan pemberian perlakuan dan (b) kultur sel makrofag tanpa pemberian perlakuan.



Keterangan:
 F1= Fraksi 1 dosis 0,126 mg/20 g BB mencit Balb/c
 F2= Fraksi 2 dosis 0,569 mg/20 g BB mencit Balb/c
 F3= Fraksi 3 dosis 1,446 mg/20 g BB mencit Balb/c
 F4= Fraksi 4 dosis 0,094 mg/20 g BB mencit Balb/c
 F5= Fraksi 5 dosis 0,220 mg/20 g BB mencit Balb/c
 Kontrol positif=Imboost® dosis 0,65 mg/20 g BB mencit Balb/c

Gambar 7. Rata-rata jumlah lateks yang difagosit oleh 100 makrofag.

Perhitungan jumlah lateks yang difagosit oleh 100 makrofag berdasarkan hasil uji anova satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% diperoleh perbedaan

yang bermakna ($p<0,05$) antara kelompok kontrol negatif dengan kelima kelompok fraksi. Dari gambar histogram di atas dapat dilihat jumlah lateks yang

difagosit oleh 100 makrofag mempunyai rata-rata yang berbeda-beda. Fraksi 2 mempunyai kemampuan terbesar untuk meningkatkan jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag dengan rata-ratanya $397,00 \pm 17,52$ kemudian berturut-turut fraksi 3 ($393,00 \pm 35,17$), fraksi 1 ($329,00 \pm 30,41$), fraksi 4 (297,33 $\pm 24,70$) dan terakhir fraksi 5 ($293,00 \pm 4,58$). Analisis lanjutan dengan LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, fraksi 2 menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan semua kelompok perlakuan. Hasil uji ini menunjukkan kelompok kontrol positif (Imbst[®]) berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak. Sehingga dapat dinyatakan bahwa penggunaan CMC 1% sebagai pembawa ekstrak tidak mempengaruhi kemampuan fagositosis lateks oleh makrofag. Fraksi 3 juga mempunyai kemampuan dalam meningkatkan fagositosis lateks oleh makrofag akan tetapi fraksi 3 tidak menunjukkan hasil yang lebih rendah dibanding terhadap kontrol positif. Kemampuan fraksi 2 untuk meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag kemungkinan menunjukkan peran sel tersebut dalam menghilangkan dan membunuh benda asing secara

ekstraseluler (mikroba) dan intraseluler (virus). Kemampuan fraksi ini dalam meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag terhadap lateks lebih poten dibanding Imboost[®] sebagai kontrol positif dengan kandungan ekstrak echinacea 250 mg.

Perbedaan aktivitas fagositosis kemungkinan dipengaruhi pemberian dosis yang berbeda dan sifat fisik-kimia kandungan senyawa yang dihasilkan. Fraksi 1 dengan kandungan terpenoid mempunyai daya fagositosis yang lebih rendah dibandingkan fraksi 2, meskipun lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi 4 dan 5 tetapi secara uji LSD tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan sehingga kemungkinan belum bisa dikategorikan sebagai imunostimulator karena efek yang ditimbulkan belum begitu jelas. Pemberian dosis yang kecil dari fraksi 1 kemungkinan mempengaruhi aktivitas sehingga belum mampu menunjukkan efek respon imunnya apakah sebagai imunosupresor atau imunostimulator. Aktifitas dari fraksi 1 kemungkinan juga dipengaruhi oleh sifat fisika-kimia dari senyawa kimia. Makrofag dapat menghancurkan sel-sel terinfeksi dan sel-sel tumor bekerjasama dengan antibodi. Aktivitas ini disebut *antibody dependent cell*

mediate cytotoxicity (ADCC/sitotoksitas dengan perantara sel yang tergantung pada antibodi) (Weir, 1990). Fraksi 1 dengan jumlah IgG yang tertinggi ternyata dapat meningkatkan aktifitas fagositosis sel makrofag. Peningkatan aktivitas melalui respon imun yang berbeda ini kemungkinan disebabkan opsonisasi. Efek opsonisasi yang diperantarai baik C3b maupun Fc akan menyebabkan terjadinya fagositosis dan perusakan oleh sel makrofag.

Perbedaan aktivitas kemungkinan dipengaruhi oleh senyawa-senyawa yang terkandung di masing-masing fraksi. Hasil identifikasi secara kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sesuai dan berbagai pereaksi semprot di perkirakan fraksi 1 mengandung golongan senyawa terpenoid. F2 mengandung golongan senyawa terpenoid, steroid, dan flavonoid. F3 mengandung golongan senyawa terpenoid; F4 mengandung golongan senyawa alkaloid dan terpenoid. Berdasarkan hasil identifikasi secara KLT terlihat bahwa fraksi 2 mempunyai jenis golongan senyawa kimia yang terbanyak dibanding fraksi yang lain, dimungkinkan ada efek sinergisme antar senyawa sehingga fraksi 2 ini mempunyai aktifitas sebagai imunostimulator yang kuat dibanding

kelompok perlakuan yang lain. Fraksi 1 mempunyai aktivitas hepatoprotektor yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang lain dilihat dari penghitungan jumlah inti piknotik. Aktifitas dari fraksi 1 kemungkinan juga dipengaruhi oleh sifat fisika-kimia dari senyawa kimia. Kemungkinan karena kandungan terpenoid dari fraksi 1 sehingga mampu memberikan penekanan terhadap reaksi peradangan. Triterpen mempunyai aktivitas antiinflamasi melalui sistem imun dengan menekan sekresi iNOS sebagai pemacu makrofag. Fraksi 1 dengan kandungan terpenoid mempunyai daya fagositosis yang lebih rendah dibandingkan fraksi 2, meskipun lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi 4 dan 5 tetapi secara uji LSD tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan sehingga kemungkinan belum bisa dikategorikan sebagai imunostimulator karena efek yang ditimbulkan belum begitu jelas. Aktifitas dari fraksi 1 kemungkinan juga dipengaruhi oleh sifat fisika-kimia dari senyawa kimia. Fraksi 2 yang poten dalam mempengaruhi aktifitas fagositosis kurang memiliki aktifitas yang tinggi dibanding fraksi 1, tetapi masih menunjukkan hasil yang berbeda secara bermakna dengan

kontrol positif dan negatif. Makrofag dapat menghancurkan sel-sel terinfeksi dan sel-sel tumor bekerjasama dengan antibodi. Aktivitas ini disebut ADCC (Weir, 1990). Berdasarkan penelitian sebelumnya (Rahayu, 2009) bahwa fraksi 2 dengan jumlah IgG yang tertinggi ternyata dapat meningkatkan aktifitas fagositosis sel makrofag. Peningkatan aktivitas melalui respon imun yang berbeda ini kemungkinan disebabkan opsonisasi. Efek opsonisasi yang diperantara baik C3b maupun Fc akan menyebabkan terjadinya fagositosis dan perusakan oleh sel makrofag. Fraksi 2 yang poten dalam mempengaruhi aktifitas fagositosis kurang memiliki aktifitas yang tinggi dibanding fraksi 1, tetapi masih menunjukkan hasil yang berbeda secara bermakna dengan kontrol positif dan negatif.

Kesimpulan

Fraksi n-heksana mempunyai aktivitas sebagai imunostimulator melalui aktifitas fagositosis makrofag. Aktifitas tertinggi dalam meningkatkan aktifitas makrofag dari tertinggi yaitu F2, F3, F1. Hasil identifikasi secara kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sesuai dan berbagai pereaksi semprot memperkirakan fraksi 1

mengandung golongan senyawa terpenoid. F2 mengandung golongan senyawa terpenoid, steroid, dan flavonoid. F3 mengandung golongan senyawa terpenoid, F4 mengandung golongan senyawa alkaloid dan terpenoid. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas fraksi 2 sebagai pemacu fagositosis makrofag secara *in vivo*, pemacu sekresi ROI maupun NO, proliferasi limfosit.

Daftar Pustaka

- American Liver Foundation, 2006. *Hepatitis B*, www.liverfoundation.org, diakses tanggal 5 Februari 2008.
- Ediati, S., 2007. The immunomodulatory mechanism extract of *Morinda citrifolia* L., fruit on hepatocelluler carcinoma of mice. *International Conference on Traditional Medicine and Medicinal Plants*, Surabaya, 8-9.
- Kapil, I.B., Koul, S.K., Banerjee, dan Gupta, B.D., 1993. Antihepatotoxic effect of major diterpenoid constituent of *Andrographolid paniculata*. *Biochemical Pharmacology*, 46: 182-185.
- Mangkuwidjojo, S., 2003. *Pedoman workshop teknologi dasar antibodi monoklonal*. Jogjakarta: Laboratorium Ilmu Hayati UGM.
- Sarker, S.D., Latif, Z., dan Gray, A.I., 2006. *Natural products isolation*,

- Second Edition. New Jersey:
Humana Press Inc.
- Sheeja, K., Kuttan, G., 2007. Activation of cytotoxic T lymphocyte responses and attenuation of tumor growth in vivo by *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 29(1):81-93.
- Wagner, H., 1984. *Immunostimulants of fungi and higher plants*. Springer-Verlag.
- Widyawaruyanti, A., 1999. *Uji imunostimulan andrographolid terhadap sekresi IFN-γ dan TNF-α oleh sekresi limfosit T helper-1 mencit dalam percobaan kultur sel*. Surabaya: Airlangga University Library.