

**EFEK IMUNOSTIMULATOR EKSTRAK ETANOL DAUN KATUK
(*Sauropus androgynus* L Merr) TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG**

Tresna Asih Santoso, Diniatik, Anjar Mahardian Kusuma

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Jl. Raya Dukuhwaluh, PO BOX 202, Purwokerto 53182
Email: anjarmahardian@ump.ac.id (Anjar Mahardian Kusuma)

ABSTRAK

Phyllanthus niruri (L) yang merupakan famili dari Euphorbiaceae diketahui memiliki efek imunostimulator. Tanaman katuk dan meniran merupakan anggota famili Euphorbiaceae, sehingga dimungkinkan memiliki kandungan senyawa yang hampir mirip. Daun katuk mengandung senyawa flavonoid yang dimungkinkan memiliki efek imunostimulator. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan apakah ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr) memiliki efek imunostimulator terhadap aktivitas makrofag. Metode yang digunakan adalah metode fagositosis makrofag. Penelitian ini menggunakan mencit jantan galur swiss umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 g dibagi menjadi 6 kelompok dan diberi ekstrak etanol daun katuk dengan dosis 35 mg/kg BB, dosis 70 mg/kg BB, 140 mg/kg BB, levamisol 2,5 mg/kg BB, stimuno 9,1 mg/kg BB dan kontrol negatif Na CMC 1% selama 7 hari. Pada hari ke-8 diinfeksi secara intraperitoneal dengan bakteri *Staphylococcus aureus* 10⁵. Analisis dilakukan menggunakan ANAVA satu arah dengan taraf kepercayaan 95%. Dari 100 sel makrofag yang memfagosit latex pada dosis 35 mg/kg BB rata-rata adalah 37,00, dosis 70 mg/kg BB rata-rata adalah 44,00, dosis 140 mg/kg BB rata-rata 49,67, stimuno 9,1 mg/kg BB rata-rata 57,67, dan levamisol 2,5 mg/kg BB rata-rata 62,00. Pada 100 sel jumlah latex yang difagosit makrofag pada dosis 35 mg/kg BB rata-rata adalah 73,00, dosis 70 mg/kg BB rata-rata 78,00, dosis 140 mg/kg BB rata-rata 84,33, stimuno 9,1 mg/kg BB rata-rata (91,67), dan levamisol 2,5 mg/kg BB rata-rata 93,00. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun katuk dosis 140 mg/kg BB memiliki efek imunostimulator.

Kata kunci: ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynus* L. Merr), fagositosis, makrofag, imunostimulator.

ABSTRACT

Phyllanthus niruri (L) of Euphorbiaceae has stimulator effect. Katuk and meniran plants are the family of Euphorbiaceae so that it is possible to contain similiar compound. Katuk leaf contain flavonoid compound it is likely to have imunostimulator. The study was to determine if the ethanol extract of katuk leaf (*Sauropus androgynus* (L) Merr) has the imunostimulator towards macrophage activites. This is an experimental research used 2-3 month male mice of swiss type with 20-30 g. They were divided into six groups and given ethanol extract of katuk leaf with certain dosages 35 mg/kg BB, 70 mg/kg BB, 140 mg/kg BB, levamisol 2.5 mg/kg BB, stimuno 9.1 mg/kg BB and negative control of

Na CMC 1% in seven days. On the 8th day, they were infected intraperitoneally by giving 10^5 *Staphylococcus aureus* bacteria. From 100 cel macrophage cell which latex was phagocytosis on dosage 35 mg/kg BB (37.00), dosage 70 mg/kg BB (44.00), dosage 140 mg/kg BB (49.67), stimuno 9.1 mg/kg BB (57.67), levamisol 2.5 mg/kg BB (62.00). The result from 100 cell of latex which was phagocyt dosage 35 mg/kg BB (73.00), dosage 70 mg/kg BB (78.00), 140 mg/kg BB (84.33) levamisol 2.5 mg/kg BB (93.00), stimuno 9.1 mg/kg BB (91.67). The result showed that on dosage 140 mg/kg BB have imunostimulator effect.

Key words: ethanolic extract of leaf (*Sauropus androgynus* (L) Merr), phagocytosis macrophage, imunostimulator cream.

Pendahuluan

Indonesia memiliki kekayaan sumber daya alam yang berlimpah dan perlu digali potensinya sehingga dapat dimanfaatkan penggunaannya. Salah satunya pemanfaatan tanaman tradisional yang belum dimanfaatkan khasiatnya secara maksimal, di antaranya penggunaan tanaman tradisional sebagai imunostimulator. Imunostimulator digunakan untuk meningkatkan sistem imun tubuh yang disebabkan karena infeksi virus dan bakteri (Djauzi, 2003).

Salah satu tanaman tradisional yang terdapat di Indonesia adalah meniran yang dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulator (Sriningsih dan Wibawa, 2006). Tanaman lain dalam anggota famili Euphorbiaceae yaitu katuk dan meniran. Tanaman dalam anggota famili yang sama dimungkinkan memiliki kandungan senyawa yang hampir mirip (Hegnauer, 1996).

Daun katuk mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang dimungkinkan memiliki efek imunostimulator. Menurut Chiang dkk. (2003), flavonoid memiliki aktivitas sebagai imunostimulator, oleh sebab itu pada penelitian ini dilihat efek

imunostimulator dari daun katuk terhadap aktivitas makrofag serta mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun katuk.

Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain metanol, etanol, simplisia daun katuk, tikus putih jantan galur swiss, Na CMC, stimuno, levamisol, etil asetat, dan giemsa.

Alat-alat yang digunakan antara lain: pipet ukur, tabung reaksi, gelas ukur, mortar, flakon, erlenmeyer, *beaker glass*, oven, timbangan, mesin penyerbuk, cawan porselen, kipas angin, nampan, sudip, kain hitam, kain penyaring, penangas air, pengaduk kayu, blender, cawan petri (Anumbra), *Laminar Air Flow* (LAF), sliding kapiler, mikroskop cahaya, mikropipet, *cover glass* (Sail Brand), sentrifuge, tabung sentrifuge steril disposable (Nunc), spuit injeksi, hemacytometer (Assisant germany), dan kamera digital.

Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur swiss berumur 2-3 bulan, berat badan 20-30 g. Sebelum digunakan

sebagai percobaan semua mencit dipelihara terlebih dahulu selama kurang lebih 4 hari untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan dan berat badan, menyeragamkan berat badan serta menyeragamkan makanannya.

Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di LPPT (Lembaga Penelitian Pengujian Terpadu) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

Ekstraksi

Ekstrak etanol daun katuk diperoleh dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 300 gram serbuk kering daun katuk dimasukkan dalam maserator, kemudian ditambahkan cairan penyari etanol 70% sebanyak 1,5 liter dan kemudian diaduk. Setelah itu dibiarkan termaserasi selama sehari semalam dalam maserator tertutup dengan pengadukan setiap hari selama 30 menit. Setelah itu maserat disaring dari ampasnya dengan menggunakan kain putih. Maserat ditambah etanol 70% sebanyak 1,2 liter, kemudian diendapkan selama sehari semalam. Selanjutnya maserat dipindahkan dari endapan dengan hati-hati, diuapkan pada cawan porselen di atas penangas air dengan pemanasan pada suhu 70 °C

sehingga diperoleh ekstrak kental dari daun katuk.

Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang ditanamkan pada media agar nutrisi miring.

Pemberian Ekstrak Etanol Daun Katuk secara Per Oral

Semua kelompok hewan coba dikelompokkan secara acak dengan dibagi menjadi 6 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor mencit. Semua pemberian dilakukan per oral setiap hari selama 7 hari. Kelompok I sebagai kontrol positif stimulo dengan dosis 9,1 mg/kg BB, kelompok II kontrol positif levamisol 2,5 mg/kg BB, kelompok III ekstrak dosis 35 mg/kg BB, kelompok IV ekstrak dosis 70 mg/kg BB, kelompok V ekstrak dosis 140 mg/kg BB, kelompok IV kontrol negatif Na CMC 1%.

Uji Fagositosis

a. Isolasi Makrofag

Mencit diinjeksi secara intraperitoneal menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus*, kemudian dibiarkan selama 1 jam bertujuan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan makrofag dalam mengaktivasi bakteri (Sriningsih dan Wibawa, 2006). Setelah itu mencit

dibunuh dengan menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan dari selubung peritoneum dengan alkohol 70%, kemudian disuntikan \pm 5 mL RPMI dingin ke rongga peritoneum (ditunggu \pm 3 menit sambil diguling-gulingkan secara perlahan). Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan penekanan organ dalam dengan 2 jari. Cairan diaspirasi dengan jarum suntik (dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus). Medium RPMI merupakan medium yang cocok untuk menumbuhkan makrofag, perut dari mencit sambil digoyang-goyangkan agar cairan makrofag dapat terlepas dari dinding rongga perut, serta sel yang terdapat di tulang belakang ikut terbawa ketika pengambilan makrofag. Diperoleh cairan yang ada pada rongga perut dengan menggunakan spuit injeksi sebanyak 3 mL, cairan makrofag yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam kulkas.

RPMI komplet 950 μ L dimasukkan ke dalam tabung, kemudian divortek. Sampel 50 μ L

dimasukkan RPMI komplet ke dalam tabung yang berisi makrofag. Volume yang dimasukkan ke dalam evendrop adalah 1 mL. Tahap selanjutnya adalah pembacaan sel menggunakan hemocytometer. Sel diresuspensikan dengan medium komplet sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /mL. Suspensi sel yang telah dihitung ditumbuhkan dalam *plate* 24 sumuran yang telah diberi *cover slips* bulat, setiap sumuran berisi 200 μ L (5×10^5 sel). Sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C kemudian sel dicuci dengan RPMI 2x kemudian ditambahkan RPMI komplet 1 mL/sumuran dan diinkubasi 24 jam.

b. Fagositosis Makrofag

Kemampuan dari fagositosis dilakukan secara *in vitro*, dengan menggunakan antigen berupa *lateks beads* dengan diameter 3 μ m yang diresuspensikan dalam PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma Chem). Makrofag peritoneum yang telah dikultur sehari sebelumnya, dicuci 2x dengan menggunakan RPMI. Kemudian ditambahkan 0,2 mL suspensi latex pada tiap sumuran, dicuci 3x dengan menggunakan PBS untuk

menghilangkan lateks yang tidak difagositosis.

Suspensi di atas apusan diambil, kemudian diletakkan di objek *glass* yang selanjutnya digunakan untuk mengamati morfologi makrofag. Serta *cover slip* yang digunakan untuk menghitung makrofag yang teraktivasi, dikeringkan pada suhu ruangan dan difiksasi selama 30 detik dengan menggunakan metanol. Kemudian metanol dibuang dan objek *glass* dan *coverslip* didiamkan sampai kering, kemudian pulas selama 30 menit dengan menggunakan Giemsa (Merck®) 20 % (v/v), dicuci dengan air suling dan dikeringkan pada suhu kamar. Morfologi makrofag dapat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100-400x, sedangkan untuk menghitung jumlah makrofag yang teraktivasi digunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x (Wijayanti, 1996).

Hasil dan Pembahasan

Diperoleh ekstrak etanol daun katuk sebanyak 71,728 g dari bobot serbuk 300 g.

Peningkatan fagositosis yang bermakna terdapat pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak daun katuk. Pada kelompok perlakuan, diberi ekstrak daun katuk yang diinfeksi dengan *Staphylococcus aureus* sehingga dapat menimbulkan respon imun non spesifik. Dalam respon imun non spesifik, makrofag memiliki peranan penting dalam proses fagositosis sehingga dapat meningkatkan kemampuan fagositosis. Perbedaan aktivitas makrofag dari mencit yang diberi perlakuan ekstrak etanol daun katuk dapat dilihat dari kemampuan jumlah makrofag yang memfagosit lateks secara *in vitro* dan jumlah lateks yang difagosit oleh 100 sel makrofag. Jumlah makrofag peritoneum yang memfagosit lateks setelah pemberian ekstrak etanol daun katuk selama tujuh hari menunjukkan bahwa kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun katuk lebih tinggi dari pada kelompok yang tidak diberi perlakuan ekstrak daun katuk (Mellawati dkk., 2010).

Tabel 1. Hasil pengamatan jumlah makrofag yang memfagosit latex tiap 100 sel

Perlakuan	Rerata ± SD
Ekstrak dosis 35 mg/kg BB	37,00 ± 5,292
Ekstrak dosis 70 mg/kg BB	44,00 ± 5,568
Ekstrak dosis 140 mg/kg BB	49,67 ± 6,110
Stimuno 9,1 mg/kg BB	57,67 ± 2, 517
Levamisol 2,5 mg/kg BB	62,00 ± 3,000
Kontrol pelarut 1%	20,00 ± 5,000

Tabel 2. Hasil pengamatan jumlah latex yang difagosit makrofag tiap 100 sel

Perlakuan	Rerata ± SD
Ekstrak dosis 35 mg/kg BB	73,00 ± 4,359
Ekstrak dosis 70 mg/kg BB	78,00 ± 6,557
Ekstrak dosis 140 mg/kg BB	84,33 ± 9,074
Stimuno 9,1 mg/kg BB	91,67 ± 1,528
Levamisol 2,5 mg/kg BB	93,00 ± 3,606
Kontrol pelarut 1%	20,33 ± 6,807

Kemampuan fagositosis ini disebabkan karena adanya senyawa flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun katuk yang dapat meningkatkan sistem imunomodulator dimana flavonoid dapat meningkatkan respon imun seluler dengan meningkatkan efektivitas proliferasi limfokin (Chiang dkk., 2003). Flavonoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis.

Uji anava dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan ekstrak etanol daun katuk pada berbagai dosis terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag. Dilihat dari nilai

signifikansi pada uji varians diperoleh nilai $p = 0,624$, dimana nilai $p > \alpha (0,05)$ sehingga nilai varians datanya sama, dan disimpulkan hasil uji anava adalah valid. Nilai F hitung $> F$ tabel dari hasil jumlah makrofag yang memfagosit latex. F hitung yang diperoleh $30,588 > 3,11$ artinya adanya perbedaan yang signifikan. Kemudian hasil dari jumlah latex yang difagositosis makrofag dimana F hitung $> F$ tabel, $64,219 > 3,11$ artinya adanya perbedaan yang signifikan.

Analisis statistik dilanjutkan dengan analisis BNT dengan metode tukey. Hasil yang diperoleh pada pengamatan jumlah makrofag yang memfagosit latex menunjukkan nilai signifikansi yang menyatakan adanya

perbedaan fagositosis yang nyata antara kontrol positif dan antara dosis 35 mg/kg BB, dosis 70 mg/kg BB. Kontrol positif yang digunakan ada 2 yaitu stimuno dan levamisol. Ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$, serta kontrol positif berbeda dengan kontrol negatif yang ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$ adalah 0,000. Pada dosis 140 mg/kg BB tidak terdapat perbedaan aktivitas fagositosis yang nyata antara kontrol positif baik stimuno maupun levamisol, hal ini menunjukkan bahwa dosis 140 mg/kg BB memiliki aktivitas sebanding antara levamisol dan stimuno, sehingga dosis 140 mg/kg BB memiliki potensi sebagai imunomodulator.

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol katuk pada dosis 140 mg/kg BB memiliki efek imunostimulator terhadap aktivitas fagositosis makrofag.

Daftar Pustaka

Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C., 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, momotertepoids, triterpenoids, Iridoid glycosides

and phenolic compounds of plantago spesies. *Planta Med.*, 69:600-604.

Djauzi, S., 2003. Perkembangan imunomodulator. Dipresentasikan pada Simposium Peranan Echinacea sebagai Imunomodulator dalam Infeksi Virus dan Bakteri, Hotel Borobudur, Jakarta, 24 Mei 2003.

Hegnauer, R., 1966. *Chemotaxonomie der pflanzen*. Holland: Universitat Leiden.

Mellawati, D., Sudarsono, Yuswanto, A., 2010. Pengaruh pemberian ekstrak zat pedas rimpang jahe emprit terhadap fagositosis makrofag pada mencit jantan yang diinfeksi dengan listeria monocytogenesis. *Majalah Obat Tradisional*, 15:112-120.

Srininingsih, Wibawa, A.E., 2006. Efek protektif pemberian ekstrak etanol herba meniran (*Phyllanthus niruri* L) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag peritonium tikus. *Artocarpus*, 6:91-96.

Wijayanti, M.A., 1996. *Peranan makrofag dalam imunitas infeksi malaria: kajian kemampuan fagositosis dan sekresi reactive oxigen intermediates makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi dan tidak diimunisasi in vitro*. Tesis, Program Pasca Sarjana UGM.