

**PENGARUH PEMBERIAN SEDUHAN TEH DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG DAN PROLIFERASI SEL LIMFOSIT MENCIT GALUR BALB/C YANG DIINDUKSI VAKSIN HEPATITIS B**

**Maria Ulfah<sup>1</sup>, Vitri Sari Nur Cahyani<sup>1</sup> dan Indira Kinasih<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Jurusan farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim

Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang 50236

Email : maria\_u\_astra@yahoo.com

**Intisari**

Sistem kekebalan tubuh mungkin mengalami penurunan oleh agen infeksi patogen yang menyebabkan tubuh mengalami penyakit. Indikasi vaksin Hepatitis B dilakukan untuk merangsang respon imun yang disebabkan oleh kandungan endotoksin dalam vaksin. Daun sirsak diketahui bisa memperbaiki sistem kekebalan tubuh. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan aktivitas imunostimulator seduhan teh daun sirsak pada aktivitas fagositosis sel makrofag dan proliferasi sel limfosit Balb /C yang diinduksi vaksin Hepatitis B beserta identifikasi kandungan kimianya. Seduhan teh daun sirsak dibuat dengan menyeduh teh dalam air panas 80 ° C selama 15 menit. Dosis teh daun sirsak yang diberikan pada tikus adalah 12, 24 dan 48 mg / mL. Uji aktivitas fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit dilakukan dengan induksi 2,6 µL / 20 g vaksin hepatitis B, kontrol positif Imboost 0,65 mg / 20 g, kontrol negatif 0,5 ml aquadest dan kontrol normal. Pemberian Imboost dan seduhan teh daun sirsak dilakukan secara oral selama 17 hari. Tikus menginduksi 2,6 µL / 20g pada hari ke 8 dan 14 dengan vaksin hepatitis b intra peritoneal dan dibunuh pada hari ke 18. Hasil kapasitas fagositosis, aktivitas fagositosis makrofag dan nilai optical densiti dianalisis secara statistik dengan menggunakan Uji Kruskal Wallis dilanjutkan dengan Uji Mann Whitney. Identifikasi kandungan senyawa flavonoid dilakukan dengan KLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teh daun sirsak memiliki aktivitas fagositosis sel makrofag dan proliferasi sel limfosit pada konsentrasi 12, 24 dan 48mg / mL. Seduhan teh daun sirsak mengandung senyawa flavonoid.

**Kata kunci :** *Imunostimulator, Kapasitas Fagositosis, Aktivitas fagositosis, Proliferasi limfosit, Seduhan teh daun sirsak.*

**Abstract**

The immune system may be decreased by pathogenic infection agents that cause the body to develop disease. Hepatitis B vaccine induction is performed to stimulate the immune response caused by endotoxin content in the vaccine. Soursop leaf is known to improve the immune system. The aim of this research is to prove immunostimulator activity of soursop leaf tea on macrophage cell phagocytosis activity and lymphocyte cell proliferation of Balb /C which induced with hepatitis B vaccine and its chemical content identification. Leaf tea soursop is made by brewing tea in 80 ° C hot water for 15 minutes. The dosage of soursop leaf tea given to mice was 12, 24 and 48 mg / mL. Activity test of macrophage phagocytosis and lymphocyte cell proliferation was performed by induction of 2.6 µL / 20 g of hepatitis B vaccine, Imboost positive control of 0.65 mg / 20 g, negative control 0.5 ml aquadest and normal control. Giving Imboost and Leaf tea soursop in orally for 17 days. Mice induced 2,6 µL/20g on 8th and 14th day with hepatitis b vaccine intra-peritoneal and killed on 18th day. The results of phagocytosis capacity, phagocytosis activity of macrophages and Optical Density values were statistically analyzed using Kruskal Wallis Test followed by Mann Whitney Test. Identification of flavonoid compound content is done by TLC. The results showed that Leaf tea soursop has macrophage cell phagocytosis activity and lymphocyte cell proliferation at concentrations 12, 24 and 48mg / mL. Leaf tea soursop sauce tea contains flavonoid compounds.

**Keywords:** *Immunostimulator, Phagocytosis Capacity, Phagocytosis Activity, Lymphocyte Proliferation, Leaf tea soursop.*

**PENDAHULUAN**

Sistem imun adalah bagian terpenting dalam sistem pertahanan tubuh. Upaya untuk meningkatkan sistem imun di dalam tubuh menjadi sangat penting dilakukan dalam rangka

mempertahankan sistem imun agar tetap maksimal. Peningkatan sistem pertahanan tubuh dapat dilakukan dengan cara pemberian imunostimulan.

Imunostimulan merupakan cara untuk meningkatkan sistem imun dengan menggunakan bahan-bahan yang dapat merangsang sistem imun (Baratawidjaja, 2010). Agen imunostimun dapat berasal dari alam berupa tanaman yang mengandung senyawa flavonoid, seperti teh.

Teh mengandung banyak manfaat bagi kesehatan. Seduhan teh hitam diketahui memiliki aktivitas sebagai imunomodulator karena dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Pantas, 2009) dan proliferasi sel limfosit (Arnas, 2009). Kandungan flavonoid seperti *quercetin* dan *epigallocatechin 3-gallate* (EGCG) dalam teh hitam dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh (Neiman *et al.*, 2009).

Dewi dkk., (2013) melaporkan, ekstrak etanol daun sirsak telah terbukti memiliki aktivitas imunomodulator dalam meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>. Ekstrak etanol *Annona muricata* mengandung senyawa flavonoid yang terbukti dapat meningkatkan jumlah sel B220 (Parlinaningrum dkk., 2014).

Flavonoid dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh karena mampu meningkatkan produksi IL-2 yang terlibat dalam aktivasi dan proliferasi sel limfosit (Tsai *et al.*, 2011), serta dapat mempengaruhi sel CD4<sup>+</sup>, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Spesific Makrofag Activating Factor*), yaitu molekul-molekul multipel termasuk IFN  $\gamma$  yang dapat mengaktifkan makrofag (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian seduhan teh daun sirsak yang diuji aktivitasnya terhadap fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit yang diinduksi vaksin Hepatitis B. Penelitian Ulfah dan Arifin (2013) membuktikan bahwa teh hijau mampu meningkatkan fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit. Seduhan teh hitam juga telah diteliti oleh Pantas (2009) hasilnya terbukti mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Keterbaruan penelitian ini adalah daun sirsak yang digunakan dibuat menjadi seduhan teh, adanya induksi vaksin Hepatitis B pada mencit galur Balb/C dan metode lateks untuk makrofag dan MTT Assay untuk limfosit.

## METODE PENELITIAN

**Bahan:** daun sirsak, aquadestilata, mencit Balb/c jantan usia 2 bulan, etanol 70% (Merck), Medium *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco), RPMI 1640 media komplet berisi FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% (v/v) (Caisson), *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Gibco), metanol (Merck), 2% Giemsa (v/v) (Merck), Imboost<sup>®</sup> (SOHO), Vaksin hepatitis B (Engerix-B<sup>®</sup>), *penicillin-streptomycin* (Gibco), fungizon /amphoterasin B (Gibco), 3  $\mu$ m *latex beads* (Sigma-Aldrich), reagen MTT, *stopper* 10% SDS (*sodium dodecyl sulphate*), HCl 0.01 N. Uji KLT senyawa flavonoid dengan fase diam *Sellulosa* (Merck), fase gerak B:A:W (4 : 1 : 5) (Merck), uap amoniak (Merck), Kuersetin (Sigma).

**Alat:** oven, *moisture balance*, timbangan elektrik (Mettler Toledo), *beaker glass*, batang pengaduk (pyrex), termometer, kertas saring, corong, kompor listrik, sonde lambung 3 ml dan spuit injeksi 1 ml, Timbangan hewan uji (Acis), alat-alat bedah steril (Smicss), *ependorf tube* (Extragen), sentrifugasi (Sorvall), petri dish steril 50 mm (Costar), spuit injeksi 3 mL (Terumo), tabung sentrifugasi 15 mL (Nunc), LAF (Nuair), *hemocytometer* (Neubauer), *inverted microscope* (Olympus), inkubator CO<sub>2</sub> 5% (Heraeus), mikroplate 96 (Costar), *microplate reader* (Bio-Rad), mikropipet (Gibson), *laminar air flow* (Nuair), *yellow & Blue tip* (Brand), *ELISA reader*, mikroplate 6 (Costar), *coverslip*, bejana KLT (Camag), kertas penjenuh, pipa kapiler, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

### Jalannya penelitian

#### Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Simplisia

3 kg daun sirsak segar dipanen, disortasi basah, dicuci dan dibilas dengan air bersih. Daun ditiriskan dan diangin-anginkan. Pengeringan dengan oven suhu 50°–70° C, setelah kering, disortasi kering dan diperoleh 0,86 kg simplisia kering. Simplisia disimpan dalam wadah kaca tertutup rapat dengan silika gel.

#### Penyeduhan Teh Daun Sirsak Untuk Perlakuan Mencit

$\text{Aktivitas Fagositosis (SFA)} = \frac{\text{jumlah makrofag yang memfagositosis partikel lateks}}{100 \text{ sel makrofag}} \times 100\% \quad (1)$
$\text{Kapasitas Fagositosis} = \frac{\text{jumlah partikel yang terfagositosis}}{\text{jumlah makrofag yang aktif (100)}} \quad (2)$

Daun sirsak sebanyak 0,72 gram diseduh dengan air panas sebanyak 15 ml suhu 80°C selama 15 menit, kemudian disaring untuk memisahkan daun dengan air, seduhan teh daun sirsak yang telah disaring didinginkan pada suhu ruangan (kurang lebih 25°C) (Pantas, 2009).

### Pembuatan Ekstrak Seduhan Teh Daun Sirsak Untuk Uji KLT

6 g serbuk daun sirsak dilarutkan dalam 400 ml air panas suhu 80°C selama 15 menit, kemudian disaring dan diuapkan pada *rotary evaporator* suhu 60°C sampai terbentuk ekstrak kental (Saputra, 2012).

### Uji Aktivitas Imunomodulator

#### Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dari seduhan teh daun sirsak dosis 12, 24 dan 48 mg/mL diberikan secara p.o (Pantas, 2009). Kontrol positifnya adalah larutan Imboost stok 2 mg/ml dengan dosis 0,65 mg/20grBB/hari secara p.o (Prastiwi dkk., 2015). Volume vaksin yang diberikan yaitu sebesar 2,6 µL/20 g BB (Khusnawati, 2015).

### Tahap Isolasi dan Inkubasi Sel Makrofag

Sel makrofag diisolasi secara aseptis dari mencit jantan galur Balb/C. Mencit dikorbkan dengan kloroform. Kulit bagian abdomen disemprot etanol 70% dan dibuat irisan kecil menggunakan gunting, lalu dirobek ke arah dada dan paha dibantu dengan ditarik menggunakan pinset sehingga kulit terlepas dan bagian peritoneum mencit terlihat. Media RPMI 10mL diinjeksikan dalam rongga peritoneum dan jangan sampai melukai organ lain. Perut ditepuk-tepuk ± 3 menit agar seluruh makrofag tersuspensi di media RPMI. Cairan dalam rongga peritoneum kemudian disedot lalu dimasukkan ke dalam konikel dan disentrifuge 1.200 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 3 ml medium RPMI komplit. Jumlah sel dihitung dengan hemositometer, dan diresuspensikan dengan RPMI komplit sehingga diperoleh suspensi sel kepadatan 2,5×10<sup>6</sup>/ml. Suspensi sel dimasukkan dalam *plate* 6 sumuran yang telah diberi *coverslip* bulat. Setiap sumuran berisi

200 µl (5×10<sup>5</sup> sel). Inkubasi dengan incubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C selama 30 menit, lalu dicuci 3 kali dengan 250 µl medium komplit dan diinkubasi selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali, dan ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml/sumuran dan inkubasi sampai 24 jam.

### Tahap Uji Fagositosis

*Latex beads* disuspensikan dalam PBS konsentrasi 2,5×10<sup>6</sup>/mL. Sel makrofag yang telah dikultur 24 jam, mediumnya diambil dengan pipet tetes kemudian sel dicuci dengan RPMI sebanyak 2 kali. Tambahkan suspensi lateks 200 µL/*well* dan diinkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37 °C selama 1 jam. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Setelah itu dikeringkan di suhu ruangan dan difiksasi metanol selama 30 detik. Metanol dibuang dan *coverslip* didiamkan sampai kering. *Coverslip* dipulas dengan giemsa 20% (v/v) selama 20 menit, dicuci dengan aquadest, diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan di suhu kamar. Seratus sel makrofag diamati dan dihitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan dihitung menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Hasil perhitungan jumlah lateks digunakan untuk menghitung nilai SFA dan kapasitas fagositosis, sebagai parameter aktivitas fagositosis makrofag.

Nilai IF dan kapasitas dapat dihitung dengan menggunakan rumus (SFA):

### Isolasi Organ Limfosit

Organ limpa diangkat dan diletakkan dalam cawan petri yang berisi PBS. Limpa dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali. Media RPMI sebanyak 10 ml dipompakan ke limpa. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifugasi 15 mL dan disentrifus pada 1200 rpm selama 10 menit. Pellet yang didapat disuspensikan dalam 1 mL ammonium klorida untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan disentrifugasi pada 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan sel limfosit disuspensikan dalam medium RPMI komplit 1 ml. Sel dihitung dengan hemositometer dan diresuspensikan lagi dengan medium RPMI

komplrit sehingga diperoleh suspensi sel dengan kepadatan  $1,5 \times 10^6$ /mL (Hertiani, 2010).

#### Uji Proliferasi Limfosit dengan Metode MTT Assay

Sel limfosit ( $1,5 \times 10^6$  sel/mL) sebanyak 100  $\mu$ L didistribusikan ke sumuran *microplate* 96-wells Plate dan diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO<sub>2</sub> suhu 37°C. Setelah itu, ditambahkan 50  $\mu$ L larutan 5mg/mL MTT pada tiap sumuran. Kemudian diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 $\mu$ L reagen *stopper* dalam HCl 0,01N. Inkubasi dilanjutkan selama 24 jam pada suhu ruang kemudian dibaca dengan ELISA Reader pada panjang gelombang 550 nm (Hertiani, 2010).

#### Identifikasi Kandungan Flavonoid dengan KLT

Identifikasi kandungan flavonoid menggunakan KLT dilakukan dengan cara menjenuhkan bejana kromatografi terlebih dahulu dengan fase gerak B:A:W (4 : 1: 5  $\frac{v}{v}$ , fase atas). Sampel uji (ekstrak seduhan teh daun sirsak) dan baku pembanding (Kuersetin) ditotolkan pada lempeng KLT dengan jarak 1 cm dari dasar lempeng, kemudian dielusi dengan fase gerak sampai batas atas pengembangan, diambil, dikeringkan, diamati baik secara visibel maupun pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya dideteksi dengan penampak bercak (uap amoniak) dan dihitung masing-masing harga R<sub>f</sub>-nya.

#### Analisis Data

##### Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag dan Proliferasi sel Limfosit

Dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS 16 *for windows* yaitu *Kruskal Wallis Test* dilanjutkan *Mann Whitney Test*.

##### Identifikasi kandungan Flavonoid

Identifikasi dilakukan dengan cara membandingkan warna bercak dan dilakukan pengamatan pada lempeng KLT di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan diuapi amoniak, kemudian masing-masing bercak dihitung harga R<sub>f</sub>-nya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Sel Makrofag

Sel makrofag diisolasi dari rongga peritoneum mencit, dikarenakan pada daerah rongga peritoneum tersebut memiliki jumlah makrofag yang cukup banyak dan mudah dalam

pengambilannya (Baratawidjaja, 2002). Mencit galur Balb/C dipilih karena galur tersebut lebih responsif terhadap ransangan eksogen (Oliverira dkk., 2012). Pemberian vaksin hepatitis B berfungsi untuk merangsang respon imun, dimana vaksin hepatitis b bertindak sebagai antigen (Cherry, 1996).

Pellet hasil dari sentrifugasi cairan peritonium mencit ditambahkan dengan medium RPMI komplrit yang berisi RPMI, *penicillin-streptomycin*, *fungizone* (*Amphotericin B*), dan FBS 10%. RPMI (*Rosewell memorial institute*) mengandung asam amino, vitamin, glukosa, garam dan berbagai bahan-bahan lainnya yang diperlukan untuk kultur sel. *Penicillin-streptomycin* berfungsi sebagai antibakteri yang bekerja dengan menghambat kontaminasi bakteri. *Fungizone* (*Amphotericin B*) berfungsi sebagai anti jamur yang bekerja dengan menghambat kontaminasi jamur. FBS berfungsi untuk mempertahankan sel tetap hidup.  $6,1 \times 10^6$  sel makrofag diperoleh dari perhitungan di *haemocytometer* dengan mikroskop perbesaran 400x. Perhitungan sel makrofag tersebut bertujuan untuk mengetahui kepadatan jumlah sel.

### Isolasi Sel Limfosit

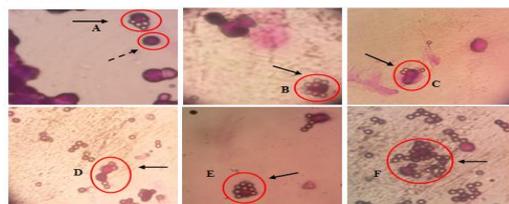
Pemberian vaksin hepatitis B bertujuan merangsang respon imun humoral melalui pembentukan antibodi dan respon imun seluler melalui aktivasi sel T sehingga mengalami proses yang berbeda dalam merangsang sistem imunitas tubuh (Radji, 2009). Sel limfosit murni dihitung dengan hemositometer dengan tujuan untuk mengetahui kepadatan sel. Jumlah sel limfosit yang dikultur adalah  $1,5 \times 10^6$  sel/mL tiap sumuran.

### Uji Fagositosis Makrofag

Uji fagositosis dilakukan dengan *latex beads* yang disuspensikan dalam RPMI komplrit. Lateks merupakan makromolekul yang bertindak sebagai benda asing yang memiliki ukuran seperti bakteri dan sangat direspons baik oleh mencit (Nester, 2004). Sel makrofag yang dicuci dengan RPMI berfungsi untuk memperbarui kebutuhan nutrisi sel makrofag. *Coverslip* merupakan tempat untuk menempelnya makrofag. Fiksasi dengan metanol dilakukan agar membran sel lebih terbuka sehingga pewarnaan dengan giemsa menjadi lebih mudah. Pengecatan dengan giemsa akan memberikan warna ungu pada

makrofag sedangkan lateks akan tetap berwarna bening, sehingga dapat membedakan antara lateks yang terfagositosis dan yang tidak terfagositosis, serta dapat memudahkan pembacaan secara mikroskopis. Lateks yang dimakan makrofag berbentuk bulatan bening, sedangkan makrofag yang tidak memakan lateks didalamnya kosong.

Perbedaan aktivitas fagositosis makrofag berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopis dapat dilihat pada gambar 1 berikut:

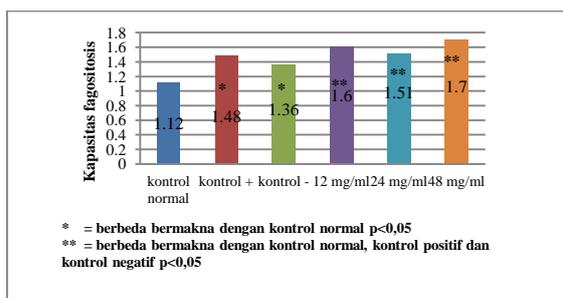


Ket:  
 (A) Kelompok kontrol negatif (E) Kelompok STDS konsentrasi 12 mg/mL  
 (B) Kelompok kontrol negatif (F) Kelompok STDS konsentrasi 24mg/mL  
 (C) Kelompok kontrol positif Imboost 0,65 mg/20grBB (G) Kelompok STDS konsentrasi 48mg/mL  
 (D) Kelompok kontrol normal

→ :makrofag tidak memfagosit lateks → :makrofag memfagosit lateks

**Gambar 1. Profil Aktivitas Fagositosis Makrofag Dilihat Menggunakan Microscop Inverted Perbesaran 400x.**

Pengamatan aktivitas fagositosis makrofag dilakukan dengan melihat parameter SFA dan kapasitas fagositosis. Nilai SFA adalah jumlah sel makrofag yang memfagositosis lateks dalam 100 sel makrofag dan kapasitas fagositosis adalah jumlah lateks yang terfagosit oleh 100makrofag. Aktivitas imunomodulator dapat diketahui dari nilai SFA dan kapasitas fagositosis seduhan teh daun sirsak yang lebih tinggi dari kelompok kontrol negatif. Kontrol positif Imboost merupakan suatu antigen yang sudah terbukti dapat meningkatkan sistem imun. Sedangkan kontrol normal digunakan sebagai pembandingan kontrol negatif. Grafik nilai kapasitas fagositosis berbagai seri konsentrasi seduhan teh daun sirsak (STDS) dapat dilihat pada Gambar 2.

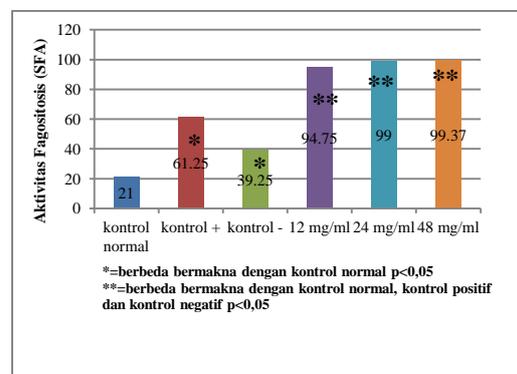


**Gambar 2. Grafik Nilai Kapasitas Fagositosis Berbagai Seri Konsentrasi STDS.**

Gambar 2 menunjukkan nilai kapasitas fagositosis kelompok konsentrasi seduhan teh daun sirsak yang lebih tinggi dari kelompok kontrol.

Data hasil pembacaan secara mikroskopis berupa SFA dan kapasitas fagositosis dianalisis secara statistik menggunakan *software* SPSS 16. Untuk nilai Kapasitas fagositosis antar kelompok kontrol dan kelompok sampel menunjukkan data terdistribusi normal dan tidak homogen. Pada *Kruskal-Wallis Test* diperoleh nilai sig < 0,05 berarti ada perbedaan aktivitas fagositosis sel makrofag antar kelompok perlakuan.

Hasil uji *mann-whitney* seluruh kelompok sampel uji STDS mulai dari konsentrasi 12, 24 dan 48 mg/mL memiliki perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal, kontrol positif Imboost dan kontrol negatif. Nilai kapasitas fagositosis sampel uji STDS antar konsentrasi 12, 24 dan 48 mg/mL tidak berbeda secara statistik, sehingga tidak dapat diketahui konsentrasi optimum untuk meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Grafik nilai SFA berbagai seri konsentrasi Seduhan Teh Daun Sirsak (STDS) dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3. Grafik Nilai Aktivitas Fagositosis (SFA) Berbagai Seri Konsentrasi Seduhan Teh Daun Sirsak (STDS).**

Gambar 3 menunjukkan nilai SFA kelompok konsentrasi sampel uji STDS lebih tinggi dari kelompok kontrol.

SFA antar kelompok kontrol dan kelompok sampel uji STDS menunjukkan data terdistribusi normal dan tidak homogen Pada *Kruskal-Wallis Test* diperoleh nilai sig < 0,05 berarti ada perbedaan aktivitas fagositosis sel makrofag antar kelompok perlakuan.

Hasil uji *mann-whitney* seluruh kelompok sampel uji STDS mulai dari konsentrasi 12, 24 dan 48 mg/mL memiliki perbedaan bermakna

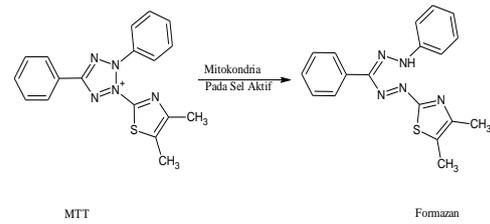
( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal, kontrol positif Imboost dan kontrol negatif. Sedangkan, antar konsentrasi 12, 24 dan 48 mg/mL tidak berbeda bermakna, sehingga tidak dapat diketahui konsentrasi optimum untuk meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

Nilai kapasitas fagositosis dan SFA makrofag pada sampel uji STDS antar konsentrasi 12, 24 dan 48 mg/mL tidak berbeda bermakna, namun sampel uji STDS masih dikatakan memiliki aktivitas imunostimulator karena adanya perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok sampel STDS. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh volume pemberian yang kurang tepat, ukuran simplisia kering yang tidak seragam, dan rentang dosis yang terlalu dekat.

Aktivitas imunostimulator STDS dapat diketahui melalui hasil analisis kapasitas fagositosis dan SFA yang menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal, kontrol positif dan kontrol negatif. Namun penelitian ini belum mendapatkan konsentrasi optimum dari sampel uji STDS yang dapat memberikan aktivitas fagositosis makrofag, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap sampel uji STDS dengan seri konsentrasi diatas 48mg/mL.

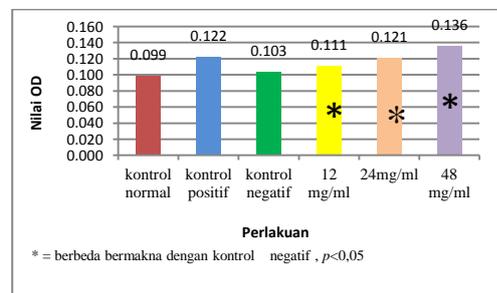
### Uji Aktivitas Poliferasi Sel Limfosit

Pengujian pengaruh pemberian seduhan teh daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap proliferasi sel limfosit dilihat dengan metode MTT Assay. Prinsip metode ini adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam sel. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) direduksi menjadi garam formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Reaksi dibiarkan terjadi selama 4 jam kemudian ditambahkan reagen stopper. Reagen stopper tersebut akan melisis membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel, serta melarutkan garam formazan tersebut. Garam formazan yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer dan diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi). Mekanisme reaksi MTT berubah menjadi formazan dapat dilihat pada Gambar 4 berikut:



**Gambar 4. Reaksi MTT berubah menjadi formazan.**

Pengamatan terhadap proliferasi sel limfosit pada penelitian ini dilakukan selama 48 jam terkait dengan dengan kandungan nutrisi dalam media yang menjadi asupan sel limfosit selama proses pengkulturan. Sel limfosit membutuhkan glukosa untuk tumbuh dan berproliferasi. Glukosa yang terkandung di dalam RPMI komplit memiliki peranan penting dalam menyediakan energi untuk kerja sel limfosit. Penggunaan glukosa yang terbatas pada sel limfosit selama lebih dari 48 jam menyebabkan sel limfosit tidak bisa melakukan proliferasi secara baik, sehingga berdampak besar terhadap kelangsungan hidup sel limfosit (Maclver *et al.* 2008). Hasil uji *Mann-Whitney* terhadap nilai OD antar kelompok konsentrasi seduhan teh daun sirsak pada waktu inkubasi 48 jam dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5. Grafik Nilai Nilai OD Limfosit Berbagai Seri Konsentrasi Seduhan Teh Daun Sirsak (STDS).**

Berdasarkan Gambar 5, terlihat bahwa pemberian sampel uji memberikan hasil peningkatan terhadap proliferasi sel limfosit. Analisa secara statistik terhadap nilai OD didapatkan hasil bahwa konsentrasi dosis 12 mg/ml, 24 mg/ml dan 48 mg/ml menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) terhadap kontrol negatif, sehingga pada semua kelompok konsentrasi dikatakan memiliki aktivitas imunostimulator.

Hasil analisa pada kelompok kontrol positif menunjukkan perbedaan pada kontrol normal dan kontrol negatif. Sedangkan hasil analisa pada kelompok kontrol positif dengan

konsentrasi dosis 12 mg/ml, 24 mg/ml dan 48 mg/ml menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna. Hal ini dapat dikatakan bahwa sampel uji semua kelompok perlakuan mampu memberikan efek imunostimulator setara dengan kontrol positif.

Hasil analisa seduhan teh daun sirsak pada konsentrasi 12 mg/ml menunjukkan perbedaan bermakna apabila dibandingkan dengan konsentrasi 24 mg/ml dan konsentrasi 48 mg/ml. Hasil analisa seduhan teh daun sirsak pada konsentrasi 24 mg/ml menunjukkan tidak berbeda bermakna apabila dibandingkan dengan konsentrasi 48 mg/ml. Sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi dosis 24 mg/ml memiliki aktivitas imunostimulator yang sama dengan konsentrasi 48 mg/ml.

Konsentrasi optimal dari pemberian sampel uji dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit belum didapatkan pada penelitian ini. Konsentrasi optimal dapat ditentukan dengan melihat konsentrasi dimana sampel uji memberikan aktivitas tertinggi, yang kemudian pada pemberian beberapa konsentrasi lebih tinggi terjadi penurunan aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit (Herbert *et al.*, 1994). Sehingga perlu dilakukan penelitian seduhan teh daun sirsak pada konsentrasi diatas 48 mg/ml. selain itu juga perlu dilakukan uji toksisitas dari seduhan teh daun sirsak agar diperoleh konsentrasi seduhan teh daun sirsak yang menyebabkan toksisitas.

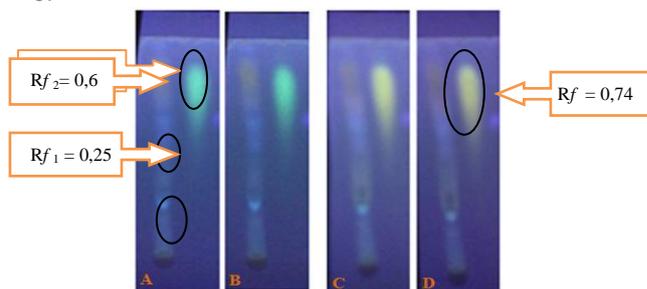
Flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit karena mampu meningkatkan produksi IL-2. IL-2 memiliki peranan besar dalam mengaktivasi sel limfosit T untuk berproliferasi. Proliferasi sel limfosit T yang dirangsang oleh antigen, diatur oleh ikatan antara IL-2 dengan reseptornya. Selain itu, IL-2 juga merangsang proliferasi dan diferensiasi sel limfosit B dan *Natural Killer* (NK) (Baratawidjaja, 2012).

Penelitian yang dilakukan oleh Tsai *et al.* (2011) diketahui bahwa *caffeic acid* dan flavonoid yang merupakan bagian polifenol dari tumbuhan *Ocimum basilicum* (Linn.) mampu meningkatkan produksi IL-2, sehingga dapat menstimulasi proliferasi sel limfosit.

### Identifikasi Senyawa Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid dalam STDS dilakukan menggunakan analisis KLT dengan menggunakan fase diam selulosa dan fase gerak B:A:W (4 : 1 : 5  $\frac{v}{v}$  fase atas).

Kromatogram identifikasi senyawa flavonoid sampel uji dapat dilihat pada gambar 6.



**Gambar 6. Kromatogram identifikasi senyawa flavonoid**

#### Keterangan :

- Pengamatan pada sinar UV 254 nm sebelum diuapi amoniak
- Pengamatan pada sinar UV 254 nm setelah diuapi amoniak
- Pengamatan pada sinar UV 366 nm sebelum diuapi amoniak
- Pengamatan pada sinar UV 366 nm setelah diuapi amoniak

Pembanding yang digunakan adalah kuersetin. Identifikasi senyawa flavonoid secara KLT menggunakan uap amoniak sebagai penampak bercak sehingga bercak dapat terdeteksi baik secara visibel maupun di bawah sinar UV.

Pada UV 254 nm sebelum diuapi amoniak sampel uji menghasilkan bercak pada  $Rf_1$  dan  $Rf_2$  berwarna biru-kehijauan berfluorosensi dan  $Rf_3$  berwarna kuning kecoklatan (Gambar 5.A), kemudian berubah menjadi lebih hijau berfluorosensi dan lebih coklat setelah diuapi amoniak (Gambar 5.B). Pada UV 366 nm sebelum diuapi amoniak sampel uji menghasilkan bercak pada  $Rf_1$  dan  $Rf_2$  berwarna hijau-kekuningan dan  $Rf_3$  berwarna coklat (Gambar 5.C), kemudian berubah menjadi lebih hijau berfluorosensi dan lebih coklat (Gambar 5.D). Bercak kuersetin sebelum diuapi amoniak terlihat hijau berfluorosensi di bawah sinar UV 254 nm (Gambar 5.A), kemudian berubah menjadi lebih hijau berfluorosensi setelah diuapi amoniak Gambar 5.B). Sedangkan di bawah UV 366 nm sebelum diuapi amoniak bercak kuersetin terlihat berwarna hijau kekuningan (Gambar 5.C), kemudian berubah menjadi lebih kuning setelah diuapi amoniak. Bercak senyawa flavonoid pada sampel uji terdeteksi pada  $Rf$  0,25; 0,6 dan 0,85 sedangkan bercak kuersetin terdeteksi pada  $Rf$  0,74. Hasil ini menunjukkan bahwa di dalam STDS mengandung beberapa jenis flavonoid.

### KESIMPULAN

- STDS memiliki aktivitas imunostimulator terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag

dan proliferasi sel limfosit mencit galur Balb/C pada konsentrasi 12 mg/ml, 24 mg/ml dan 48 mg/ml.

2. Seduhan teh daun sirsak mengandung senyawa flavonoid.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Arnas.,Y., (2009), Pengaruh Pemberian Seduhan Teh Hitam (*Camellia sinensis*) Dosis Bertingkat terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit *Balb/C* yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Baratawidjaja, K.G. dan Rengganis, I., (2012), *Imunologi Dasar*, Edisi ke-10, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 29-32, 61-64, 69, 73, 583.
- Cherry, J.D., (1996), Historical Review of Pertussis and the Classical Vaccine, *The Journal of Infections Diseases*.
- Dewi,L.K., Widyarti, S., dan Rifa'i M., (2013), Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Peningkatan Jumlah Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Timus Mencit (*Mus musculus*), *Jurnal Biotropika*, Universitas Brawijaya, Malang.
- Herbert, T.B., Coriell, M., and Cohen, S., (1994), Analysis of Lymphocyte Proliferation Data : Do Different Approaches Yield the Same Results?, *Brain Behavior Immunity*, Vol 8, 153-162.
- Hertiani, T., Sasmito E., Sumardi, dan Ulfh, M., (2010), Preliminary Study on Immunomodulatory Effect of Sarang-Semut Tubers *Mymecodiatuberosa* and *Mymercodiapendens*, *Online Journal of Biological Sciences*, Vol 10 (3), 136-141.
- Khusnawati, N.N., Pramono, S., Sasmito, E., (2015), Pengaruh Ekstrak Etanolik 50% Herba Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban) terhadap Peningkatan Proliferasi Sel Limfosit Mencit Jantan Galur Balb/C yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Traditional Medicine Journal*, 20, 164-169.F
- MacIver, K., Lloyd, D. M. Kelly, S., Roberts, N., and Nurmikko, T., (2008), Phantom limb pain, cortical reorganization and the therapeutic effect of mental imagery, *Brain*. Aug; 131(8): 2181–2191
- Neiman, D.C., Henson, U.A., Maxwell, K.R., Williams, S.R.M., Mcanulty, S.R., Jin, F.,Shanely, R.A., & Lines, T.C., (2009), Effects of Quercetin and EGCG on Mitochondrial Biogenesis and Immunity, *Medicine & Science In Sports andExercise*, Vol 9, 1467-1475.
- Nester, E.W., Evans C.R., Nancy P., Denise G.A., Martha T.T., (2004), The Genus: *Staphylococcus* In: Nester EW ed. *Microbiology a Human Perspective. 2nd* McGrew Hill, New York,pp.693-695.
- Oliveira, C.M., Garavazo, B.R., and Rodrigues, C.E.C., (2012), Liquid–liquid Equilibria for Systems Composed of Rice Bran Oil and Alcohol-Rich Solvents: Application to Extraction and Deacidification of Oil, *Journal of Food Engineering*, 110(3), pp. 418–427.
- Pantas, F. M., (2009), Pengaruh Pemberian Seduhan Teh Hitam (*Camellia sinensis*) Dosis Bertingkat terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Parlinaningrum, D., Widyarti, S., dan Rifa'i, M., (2014), Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol *Annona muricata* Linn. Terhadap Peningkatan Jumlah B220 pada *Mus musculus*, *Jurnal Biotropika*, 2.
- Prastiwi, R., Kistrini, Iqbal, A., dan Kristi, A., (2015), Aktivitas Immunomodulator Ekstrak *n*-Heksana, Etil Asetat, dan Metanol Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.), *Journal of Pharmaceutical Science and Pharmacy Practice*, 2.
- Radji, D. L., (2009). Hubungan Citra Merek, Kepuasan Dan Loyalitas. Konsumen. *Jurnal Bisnis Dan Manajemen* Maret 2009 vol.X no.1, hal 17- 34.
- Saputra, K.A., Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase secara *In Vitro* pada Teh Celup Kombinasi Daun Gandarusa (*Justicia gendarussa* Burn.) dan Kaliks Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Jakarta.
- Tsai, K.D., Lin, B.R., Perng, D.S., Wei, J.C., Yu, Y.W., and Ming Cherg, J., (2011), Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Ocimum basilicum* (Linn.) and some of its constituents on human immune cells, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol 5 (10), 1873-1883.
- Ulfah, M., dan Arifin, I., (2013), Teh Jamur Kombucha sebagai Immunomodulator terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit Galur Balb/c secara *In Vitro*, *Prosiding*

*Simposium Nasional, “Peluang dan Tantangan Obat Tradisional dalam Pelayanan Kesehatan Formal”, 95-100.membunuh bakteri, Media Medika Indonesia; 40 : 76-81.*