


# Uji Efek Immunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper Betle L.*) terhadap Peningkatan Aktivitas Fagositosis pada Mencit (*Mus musculus*)

*Testing The Effect of Immunomodulators Ethanol Extract of Green Betel Leaf (Piper betle L.) on Increasing Phagocytosis Activity in Mice (Mus musculus)*

Osie Listina<sup>1</sup>, Arifina Fahamsya<sup>2</sup>, Diah Ayu Nabila Rahma<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Prodi Farmasi, Universitas Bhamada Slawi, Indonesia

E-mail: <sup>1</sup>osie.listina@bhamada.ac.id, <sup>2</sup>arifina.fahamsya@gmail.com, <sup>3</sup>ayunr57@gmail.com

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<b>Article History:</b> Received: Feb, 15, 2023 Revised: Feb, 17, 2023 Accepted: Feb, 20, 2023	<i>The development of knowledge on the use of natural ingredients was chosen as an alternative immunomodulator. This study aims to find out and prove that green betel leaf ethanol extract (Piper betle L.) has immunomodulatory activity using carbon cleaning methods in male white mice. A total of 25 male white mice were divided into 5 groups consisting of group 1 as a negative control given aquadestillate, group 2 as a positive control given a dose of 10 mg/KgBW, groups 3, 4 and 5 given green betel leaf ethanol extract with successive doses of 100, 200 and 400 mg/KgBW. The treatment was given orally as much as 1.0 mL for 6 days. On the 7th day, an immunomodulatory test of the carbon cleaning method was carried out. The results showed that the ethanol extract of green betel leaf dose 400 mg/ KgBW showed the highest immunomodulatory effect compared to doses of 100 and 200 mg/KgBW. The phagocytosis index produced from the treatment of green betel leaf ethanol extract doses of 100, 200 and 400 mg/KgBW on test animals was -16.5: 66.6 and 92.4. Based on the results of statistical tests, the administration of green betel leaf ethanol extract dose of 100 mg/KgBW is immunosuppressant, doses of 200 and 400 mg/KgBW are immunostimulan. The best phagocytosis activity was found in the administration of green betel eaf ethanol extract dose of 400 mg/KgBW with significant differences in the group of test animals given Stimuno (<math>p &gt; 0.05</math>). Green betel leaf ethanol extract has immunomodulatory activity.</i>
<b>Keywords:</b> Green Betel, Leaf, Imunomodulator, Mice, Carbon Clean,	
<b>Corresponding Author:</b> <b>Osie Listina*</b> Email: <a href="mailto:osie.listina@bhamada.ac.id">osie.listina@bhamada.ac.id</a>	

## Abstrak

Perkembangan pengetahuan penggunaan bahan alam dipilih sebagai alternatif immunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle L.*) mempunyai aktivitas immunomodulator menggunakan metode bersihan karbon pada mencit putih jantan. Sebanyak 25 ekor mencit putih jantan dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok 1 sebagai kontrol negatif yang diberikan aquadestilata, kelompok 2 sebagai kontrol positif diberikan stimuno dosis 10 mg/KgBB, kelompok 3, 4 dan 5 yang diberikan ekstrak etanol daun sirih hijau dengan dosis berturut-turut yaitu 100, 200 dan 400 mg/KgBB. Perlakuan pemberian diberikan secara oral sebanyak 1,0 mL selama 6 hari. Pada hari ke-7 dilakukan uji immunomodulator metode bersihan karbon. Hasil penelitian menunjukkan adanya ekstrak etanol daun sirih hijau dosis 400 mg/kgBB menunjukkan efek immunomodulator yang paling tinggi dibandingkan dengan dosis 100 dan 200 mg/KgBB. Indeks fagositosis yang dihasilkan dari pemejanaan ekstrak etanol daun sirih hijau dosis 100, 200 dan 400 mg/kgBB terhadap hewan uji yaitu -16,5: 66,6 dan 92,4. Berdasarkan hasil uji statistik, pemberian ekstrak etanol daun sirih hijau dosis 100 mg/kgBB bersifat immunosuppressan, dosis 200 dan 400 mg/KgBB bersifat immunostimulan. Aktivitas fagositosis yang paling baik ditemukan pada pemberian ekstrak etanol daun sirih hijau dosis 400 mg/KgBB dengan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok hewan uji yang diberi Stimuno ( $p>0,05$ ). Ekstrak etanol daun sirih hijau memiliki aktivitas immunomodulator.

**Kata kunci:** daun sirih hijau, imonomodulator, mencit, bersihan karbon.

## 1. PENDAHULUAN

Gaya hidup yang modern menuntut semuanya serba cepat dan instan. Kualitas makanan yang dimakan, polusi udara, kurang olah raga dan stress dapat menyebabkan penurunan daya tahan tubuh. Kondisi tersebut meMbuat mikroba patogen seperti virus, bakteri, parasit dan jamur dengan mudah dapat menembus dan menyerang tubuh, menyebabkan berbagai penyakit menular dan degeneratif, bahkan dapat menyebabkan penuaan dini [17]. Agar tubuh dapat terus

mempertahankan keutuhannya diperlukan obat yang digunakan untuk mengembalikan serta memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu. Sistem imun yang terganggu dapat diperbaiki dengan pemberian bahan-bahan yang disebut golongan imunomodulator. Imunomodulator adalah zat atau agen yang dapat berinteraksi dengan sistem kekebalan tubuh dan menyebabkan peningkatan atau penurunan aspek spesifik dari respon imun. Respon imun dapat diartikan sebagai suatu sistem bagi tubuh untuk menjaga keseimbangan antara lingkungan internal maupun eksternal [6]. Secara umum terdapat dua kategori golongan imunomodulator berdasarkan efeknya yaitu immunosuppressan (meningkatkan) dan imunostimulan (meningkatkan) [13].

Salah satu upaya penanggulangan masalah kesehatan dengan adanya peranan tanaman obat yang berkhasiat perlu ditingkatkan. Upaya dilakukan dengan melakukan pengenalan, pengujian dan pengembangan khasiat tanaman obat. Bahan alam banyak digunakan sebagai alternatif pilihan agen imunomodulator. Beberapa tanaman yang sudah terbukti memiliki aktivitas imunomodulator adalah meniran (*Phyllanthus niruri* L.), mengkudu (*Morinda Citrifolia*) dan sambiloto (*Andrographis paniculata*) [25]. Imunostimulan digunakan sebagai terapi tambahan untuk penyakit yang disebabkan oleh organisme patogen, membantu meringankan gejala penyakit infeksi serta mempercepat proses penyembuhannya, jika belum terkena penyakit imunostimulan bisa dipakai sebagai tindakan preventif untuk mencegah penyakit, serta untuk meningkatkan daya tahan tubuh [7].

Daun sirih hijau memiliki kandungan senyawa fitokimia seperti tanin, saponin, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan minyak atsiri. Salah satu senyawa yang berpotensi sebagai agen imunomodulator adalah flavonoid, alkaloid dan tanin, kandungan senyawa antioksidan ekstrak etanol daun sirih hijau berpotensi menghasilkan efek imunomodulator karena dimanfaatkan untuk menjaga kesehatan dan mengobati penyakit [20]. Menurut Sasmito (2017) tentang imunomodulator bahan alami, senyawa flavonoid dapat menambah sistem kekebalan tubuh sehingga mampu menangkal serangan virus, bakteri atau zat lain dengan meningkatkan aktivitas sistem kekebalan tubuh dari makrofag ditunjukkan dengan peningkatan kapasitas fagositosis, enzim lisosom dan modulasi pelepasan oksida oleh makrofag. Senyawa flavonoid dapat bekerja pada limfokin yang diproduksi oleh sel T untuk merangsang sel fagosit untuk melakukan respon fagositik.

Salah satu pengujian efek imunomodulator yaitu menggunakan metode *clearance* (bersihan karbon) dilakukan untuk mengukur aktivitas sel imun non-spesifik untuk mengeliminasi sel patogen yang masuk ke dalam tubuh. Tes ini didasarkan pada kecepatan sel fagositik menelan zat asing setelah menerima zat imunomodulator. Zat atau partikel asing yang digunakan dalam penelitian ini adalah tinta karbon [11].

## 2. METODE PENELITIAN

### a. Peralatan dan Bahan

Alat yang dipakai adalah blender Philips (HR2068), toples berwarna gelap, oven (getra), batang pengaduk, *waterbath* (Thermostat water bath HH-60), timbangan hewan (SF-400), timbangan analitik (solid analytical balance tipe No. USS-DBS1604004), jarum sonde oral, spuit injeksi 1 Cc (One Med), pipet tetes, pipet volum (*pyrex*), kuvet, spektrofotometri UV-Vis (*shimadzu*), *stop watch*, kandang mencit, kandang *restriksi* mencit, tempat makanan mencit, tempat minuman mencit.

Bahan yang dipakai untuk kajian ini yaitu Daun sirih hijau, fitofarmaka @Stimuno, CMC Na, tinta cina pelican (4001 blue), NaCl 0,9% (teknis), asam asetat (teknis), heparin (generik), etanol 96% (teknis), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (teknis), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (teknis), pereaksi *dragendorf* (teknis), FeCl<sub>3</sub> 1% (teknis), aquadest, klorofom (pro analisis), etil asetat (teknis), butanol (teknis), AlCl<sub>3</sub> 10% (teknis), methanol (pro analisis), FeCl<sub>3</sub> 5% (teknis) dan lempeng KLT.

Hewan yang dipakai untuk kajian ini yaitu Hewan uji yang digunakan yaitu mencit putih (*Mus musculus* L.) galur Wistar jantan, umur 2-3 bulan, berat badan rata-rata 30-40 gram sebanyak 25 ekor.

### b. Proses Preparasi

Daun sirih hijau disortasi kondisi basah dan dibersihkan, daun dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Selanjutnya dilakukan sortasi kering, kemudian daun sirih hijau diserbuk dengan blender dan diayak dengan bantuan ayakan 40 mesh. Semakin kecil ukuran bubuk, semakin tinggi hasil ekstraksi yang dicapai.

### c. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, sebanyak 500 gram serbuk simplisia daun sirih

hijau dimasukkan ke dalam *chamber*, ditambahkan dengan 2500 mL etanol 96%, kemudian ditutup dan dibiarkan selama 72 jam terlindung dari cahaya sambil dilakukan pengadukan beberapa kali. Setelah selesai proses maserasi, maserat di pisahkan dengan cara di saring dengan kain flanel dan kertas saring. Maserat yang dihasilkan diuapkan dengan menggunakan *waterbath* hingga dihasilkan ekstrak kental [12]. Selanjutnya ekstrak dilakukan uji parameter ekstrak untuk mengetahui kualitas ekstrak dan uji skrining fitokimia digunakan mengukur kandungan senyawanya.

#### d. Karakterisasi Ekstrak

##### Penetapan Kadar Air Ekstrak

Uji kadar air dilakukan dengan alat moisture analyzer dengan prinsipnya dapat menguapkan air yang terkandung pada ekstrak dengan cara pemanasan pada suhu 105°C. Timbang 0,5 gram ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam alat dan hasilnya persentase terdapat layar skala yang paling umum [23].

##### Penetapan Susut Pengerinan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1-2 gram dalam botol timbang dangkal, tertutup dengan botol yang telah dipanaskan sebelumnya hingga suhu penentuan yang dicairkan. Bahan dalam botol dipipihkan dengan mengocok botol, sampai membentuk lapisan setebal 5-10 mm, dimasukkan ke dalam ruang pengering, dibuka tutupnya dan dikeringkan pada suhu sampai konstan bobot. Setiap sebelum pengeringan, botol dibiarkan tertutup hingga dingin dalam desikator pada suhu kamar [10].

##### Penetapan Kadar Abu Total

Ekstrak ditimbang sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam krus yang telah dipijarkan dan ditimbang, pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Untuk arang tak lepas, ditambahkan air, diaduk, disaring melalui kertas saring abu. Kertas saring dan sisa filter berada dalam wadah yang sama. Filtrat ditempatkan dalam krus, dinyalakan diuapkan hingga berat konstan [10].

##### Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Kadar abu tidak larut asam, dilakukan dengan melarutkan abu dari hasil penetapan kadar abu total sebanyak 25 mL asam sulfat encer dandidihkan selama 5 menit. Kemudian bagian yang tidak larut disaring menggunakan kertas saring bebas abu. Kertas saring tersebut dicuci dengan aquadest panas dan kertas saring dimasukan kedalam krus porselen. Krus porselen yang berisi kertas saring dimasukan kedalam furnace diatur suhu pada 600°C selama 30 menit. Kemudian krus porselen di desikator selama 10 menit. Ditimbang krus porselen yang berisi abu dan dihitung persentasenya [10].

##### Penetapan Bobot Jenis

Penentuan bobot jenis ekstrak dapat dilakukan dengan menimbang piknometer vakum dalam keadaan kosong. Lalu piknometer diisi air dan ditimbang. Massa jenis air dapat ditentukan. Piknometer telah dikosongkan dan diisi ekstrak [10].

##### Uji Organoleptis

Ekstrak yang diperoleh di uji secara organoleptik menggunakan panca indra yang menyatakan bentuk, warna, rasa dan bau dari ekstrak [10].

#### e. Skrining Fitokimia

##### Pemeriksaan Alkaloid

Dilakukan uji alkaloid dengan menimbang 0,5 gram ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan ditambahkan 8 tetes larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N kemudian ditambahkan 3 tetes tester dragendroff. Hasilnya ditunjukkan dengan endapan jingga pada pereaksi Dragendroff [16].

##### Pemeriksaan Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menimbang ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebanyak 0,5 gram dan ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Hasilnya ditunjukkan dengan munculnya warna hijau atau warna hijau kehitaman [4].

##### Pemeriksaan Saponin

Uji saponin dilakukan dengan menimbang ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambahkan 10 mL aquades hangat, lalu dikocok selama 30 detik. Hasilnya ditandai dengan adanya buih pada larutan [1].

##### Pemeriksaan Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan menimbang ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebanyak 0,5 gram dengan penambahan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> melalui dinding tabung. Hasilnya di tunjukkan dengan

terbentuknya warna hijau dan warna biru [16].

#### **Pemeriksaan Tanin**

Uji tanin dilakukan dengan menimbang ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebanyak 0,5 gram ditambahkan larutan FeCl<sub>3</sub> 1%, hasilnya ditunjukkan dengan ditandai terbentuknya warna hijau kebiruan [5].

#### **Pemeriksaan Minyak Atsiri**

Uji minyak atsiri dilakukan dengan cara menimbang ekstrak kental daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebanyak 0,5 gram yang diencerkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1 mL lalu dipanaskan di hot plate di atas gelas arloji hingga diperoleh residu. Hasil positif terdapat minyak atsiri ditandai dengan bau khas pada residu [8].

#### **f. Uji Kandungan Kimia Ekstrak Metode Kromatografi Lapis Tipis**

##### **Alat**

Alat yang digunakan untuk kromatografi lapis tipis yaitu lempeng silica gel GF 254, zat penyerap, bejana kromatografi, pipet mikro dan lampu ultraviolet 254 nm.

##### **Penjenuhan Bejana**

Kertas saring ditempatkan pada bejana kromatografi. Tinggi kertas saring ±18 cm dan lebarnya ±2 cm. Eluen yang digunakan untuk identifikasi senyawa flavonoid yaitu n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 3:7 [25]. Sedangkan eluen yang digunakan untuk uji senyawa tanin yaitu metanol:air dengan perbandingan 6:4 [16].

##### **Prosedur KLT**

Lempeng KLT diaktifkan dengan cara dioven selama 30 menit dengan suhu 100°C. Kemudian ditotolkan ekstrak daun sirih yang sudah diencerkan dengan etanol. Dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi fase gerak. Larutan fase gerak dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penyerap, tolong jangan sampai terendam. Letakkan tutup bejana pada tempatnya dan biarkan sistem hingga fase gerak merambat sampai batas jarak rambat. Keluarkan lempeng dan keringkan di udara dan amati bercak pada sinar tampak ultraviolet gelombang pendek (254 nm). Ukur dan catat jarak tiap bercak dari titik penotolan serta catat panjang gelombang untuk tiap bercak yang diamati dan tentukan harga R<sub>f</sub> [10].

#### **g. Pembuatan Suspensi Karbon**

Pembuatan suspensi karbon dilakukan dengan cara mensuspensikan 1,6 mL tinta cina pelican (4001 blue) ke dalam 8,4 mL suspensi CMC Na 1% dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% [14].

#### **h. Pengenceran Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)**

Ekstrak daun sirih hijau ditimbang sesuai dosis yang diperlukan kemudian ditambahkan aquadest panas 90°C, didinginkan sehingga infusa daun sirih hijau siap diberikan pada hewan uji.

#### **i. Uji Efek Imunomodulator Metode Bersihan Karbon (*Carbon Clearance*)**

Metode aktivitas imunomodulator telah lolos pengujian Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran UNNISULA Semarang, dengan nomor sertifikat: No.380/VII/2019/Komisi Bioetik (Luhurningtyas *et al.*, 2020). Hewan uji yang telah diaklimatisasi selama 1 minggu, dibagi menjadi 5 kelompok, berdasarkan rumus *Federer* dengan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Kelompok perlakuan pertama sebagai kontrol negatif diberikan aquadestilata sebanyak 1,0 mL secara per oral. Kelompok perlakuan kedua sebagai kontrol positif diberikan larutan imunostimulan (Stimuno) dengan dosis 10 mL/KgBB. Kelompok perlakuan ketiga diberi ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan dosis 100 mg/KgBB. Kelompok perlakuan keempat diberi ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan dosis 200 mg/KgBB. Kelompok perlakuan kelima diberi ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan dosis 400 mg/KgBB.

Masing-masing kelompok diberikan perlakuan 1 kali sehari selama 6 hari, melalui pemberian per oral. Selain perlakuan hewan uji tetap diberikan pakan dan air *ad libitum* selama pengujian. Pada hari ke-7 sebelum mencit diinjeksi dengan tinta karbon, darah mencit pada kelompok kontrol negatif diambil terlebih dahulu melalui sinus orbitalis yang akan digunakan sebagai blanko pada penetapan transmittan/absorbansi.

Tinta karbon disuntikkan secara intravena sebanyak 0,1 mL pada kelompok 2-5, darah diambil secara berkala melalui sinus orbitalis pada menit ke-5, ke-10 dan ke-15 kemudian darah ditampung pada plat tetes yang sudah diberi sedikit heparin. Darah diambil sebanyak 10 µL, masing-masing darah ditambahkan 4 mL asam asetat 1% untuk meliliskan sel darah merah, kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada range panjang gelombang darah mencit 632 nm.

### j. Analisis Data

Hasil absorbansi masing-masing sampel digunakan untuk menghitung nilai konstanta fagositosis (K) dan indeks fagositosis ( $t_{1/2}$ ) menggunakan rumus berikut:

$$K = \frac{\ln OD1 - \ln OD2}{t2 - t1}$$

Keterangan:

K : Konstanta fagositosis

OD 1 : Absorbansi pada menit ke-0

OD 2 : Absorbansi pada menit ke-5, 10 dan 15

t : Waktu (menit ke-5, 10 dan 15)

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K}$$

Keterangan :

$t_{1/2}$  : Waktu paruh eliminasi karbon

K : Konstanta fagositosis

Data hasil penelitian berupa nilai konstanta fagositosis dari seluruh kelompok perlakuan yang sudah diujikan kemudian dianalisis secara statistik menggunakan metode ANOVA satu arah. Perbedaan nyata ditunjukkan dengan nilai  $<0,05$  Untuk mengetahui nilai perbandingan yang signifikan masing-masing kelompok perlakuan. Data dapat dikatakan signifikan apabila nilai  $p < 0,05$  dan data dapat dikatakan tidak signifikan apabila nilai  $p > 0,05$ . Perbedaan yang signifikan ini dapat menjelaskan aktivitas fagositosis yang diberikan pada sel makrofag yang meningkat setelah pemberian ekstrak etanol daun sirih hijau pada mencit putih jantan [19].

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### a. Ekstraksi

Dari 3,5 kg sampel daun sirih hijau diperoleh ekstrak kental sebanyak 44 gram dan randemennya adalah 8,8%. Hasil uji organoleptik ekstrak etanol daun sirih hijau berbentuk cairan kental, berwarna hitam pekat mengkilat, rasa pahit dan aroma khas daun sirih.

### b. Karakterisasi Ekstrak

Hasil penetapan karakterisasi ekstrak non-spesifik dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Parameter Ekstrak

Parameter Ekstrak	Hasil
Uji Kadar Air	2,33 %
Uji Susut Pengeringan	0,45 %
Uji Kadar Abu Total	0,11 %
Uji Kadar Abu Tidak Larut Asam	-1,15 %
Uji Bobot Jenis	1,001 g/mL

### c. Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia menunjukkan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun sirih hijau. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 2.

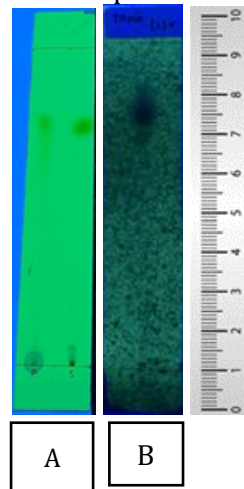
**Tabel 2.** Hasil Skrining Fitokimia

Golongan Senyawa	Hasil
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Terpenoid	+
Tanin	+
Minyak atsiri	+

### d. Uji Kandungan Kimia Ekstrak Metode Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi kandungan metabolit sekunder metode kromatografi lapis tipis menunjukkan positif mengandung senyawa flavonoid dan tanin. Berdasarkan nilai Rf spot sampel yang

mendekati atau sama dengan Rf spot pembanding, pada senyawa flavonoid menghasilkan nilai Rf sebesar 0,7 dan pada senyawa tanin menghasilkan nilai Rf sebesar 0,78. Terdapat kandungan flavonoid pada daun sirih hijau, pada literatur dijelaskan jenis flavonoid dengan nilai Rf sebesar 0,7 adalah kuersetin jenis flavonol [16]. Hasil KLT dapat dilihat pada gambar 1.

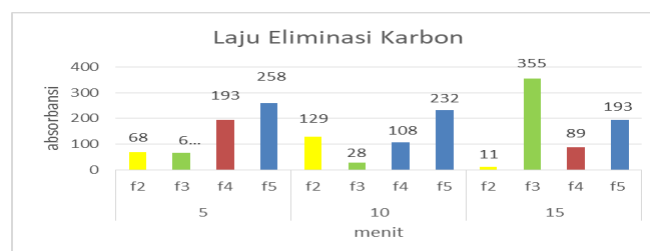


**Gambar 1.** Pola Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

- 1) Identifikasi flavonoid. Fase diam silika GF 254 nm. Fase gerak n-heksan:etil asetat (3:7).
- 2) Identifikasi tanin. Fase diam silika GF 254 nm. Fase gerak metanol:air (6:4).

#### e. Uji Efek Imunomodulator Metode Bersihan Karbon (*Carbon Clearance*)

Pada penelitian ini dilakukan pengujian respon imun non-spesifik menggunakan metode bersihan karbon (*Carbon Clearance*) yaitu pengukuran secara spektrofotometer laju eliminasi karbon dari darah hewan. Uji ini merupakan respon imun non-spesifik untuk mengetahui aktivitas fagositosis sel makrofag terhadap karbon sebagai benda asing/antigen yang diberikan secara intravena. Karbon akan berkurang jumlahnya dalam darah seiring pertambahan waktu, karena adanya peristiwa fagositosis oleh sel-sel leukosit terutama sel neutrophil, sel monosit dan sel makrofag [3]. Laju eliminasi karbon merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas fagositosis pada mencit. Hasil laju eliminasi karbon dalam darah ditunjukkan pada gambar 2.



**Gambar 2.** Grafik Laju Eliminasi Karbon

Keterangan:

Warna Kuning = Kelompok 2 kontrol positif @Stimuno dosis 10mg/KgBB.

Warna Hijau = Kelompok 3 EEDSH dosis 100mg/KgBB.

Warna Merah = Kelompok 4 EEDSH dosis 200mg/KgBB.

Warna Biru = Kelompok 5 EEDSH dosis 400mg/KgBB.

Pada gambar 2. dapat dilihat berdasarkan nilai rata-rata absorbansi panjang gelombang karbon dalam darah mencit yang telah diukur menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 632 nm, terlihat penurunan pada tiap rentang waktu, yang menandakan setiap dosis ekstrak etanol daun sirih hijau yang diuji dapat memberikan efek imunomodulator. Tujuan penggunaan variasi dosis ekstrak etanol daun sirih hijau pada pengujian ini untuk mengetahui hubungan antara peningkatan dosis ekstrak etanol daun sirih hijau dengan aktivitas penurunan karbon dalam darah mencit. Pada penelitian ini penurunan nilai absorbansi terbesar terdapat pada dosis 100 mg/KgBB dan disimpulkan bahwa semakin menurunnya nilai absorbansi berarti konsentrasi karbon yang tertinggal dalam darah mencit semakin sedikit. Karbon atau racun yang

masih tertinggal di dalam tubuh akan melakukan pembentukan sistem imun non spesifik yang berupa sel fagosit. Sel fagosit akan diaktifkan karena terjadinya rangsangan sistem imun non spesifik kemudian dengan cepat akan menganalisa antigen asing yang masuk ke dalam tubuh lalu akan membersihkan dan menghancurkan antigen (karbon) yang terdapat dalam darah [29].

Setelah mendapatkan nilai absorpsi kemudian dilanjutkan dengan melakukan perhitungan nilai konstanta fagositosis. Konstanta merupakan parameter fagositosis, jika semakin besar nilai konstanta fagositosis yang dihasilkan maka menunjukkan semakin tinggi proses bersihan karbon. Sehingga sel fagosit semakin cepat bekerja dalam melakukan proses fagositosis. Setelah perhitungan nilai konstanta fagositosis dilanjutkan perhitungan indeks fagositosis yang bertujuan untuk membandingkan nilai konstanta fagositosis setiap kelompok uji. Semakin besar nilai konstanta dan indeks fagositosis maka semakin cepat proses fagosit yang dilakukan. Jika nilai rata-rata indeks fagositosis yang didapatkan lebih kecil dari 1 ( $IF < 1$ ) berarti zat tersebut memiliki aktivitas sebagai immunosupresan, jika nilai indeks fagositosis yang didapatkan lebih besar dari 1 ( $IF > 1$ ) memiliki aktivitas sebagai immunostimulan [18]. Hasil konstanta fagositosis dan indeks fagositosis dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Aktivitas Fagostik Pada Uji *Carbon Clearance* Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Kel	KF	IF	Klasifikasi
1	-	-	-
2	-0,0042	-165	Imunosupresan
3	-0,042	-16,5	Imunosupresan
4	0,0104	66,6	Imunostimulan
5	0,0075	92,4	Imunostimulan

Ket : KF (Konstanta Fagositosis)

IF (Indeks Fagositosis)

Berdasarkan nilai indeks fagositosis tersebut maka dapat diartikan bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau dosis 100 mg/KgBB bersifat sebagai immunosupresan (menekan), sedangkan ekstrak etanol daun sirih hijau dosis 200 mg/KgBB dan dosis 400 mg/KgBB bersifat immunostimulan (meningkatkan), immunostimulan merupakan cara meningkatkan fungsi sistem kekebalan tubuh dengan menggunakan obat-obatan yang merangsang sistem. Kelompok kontrol positif stimulo dosis 10 mg/KgBB bersifat sebagai immunosupresan (menekan), immunosupresan merupakan suatu tindakan yang ditunjukkan untuk menekan respon, penggunaan klinisnya untuk berbagai reaksi penolakan dan pada penyakit inflamasi yang dapat menyebabkan kerusakan sistem. Pada dosis 400 mg/KgBB menunjukkan aktivitas fagositosis tertinggi yaitu sebesar 92,4 yang hasilnya lebih tinggi dari kelompok kontrol positif sebesar -165. Dari nilai indeks fagositosis dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau dapat meningkatkan fagositosis terhadap karbon, artinya ekstrak etanol daun sirih hijau memiliki kemampuan sebagai immunomodulator.

Metode penyarian ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi, sebab disamping perlakuan yang sederhana, mudah dan bisa menghindari kemungkinan terjadinya penguraian zat aktif yang terkandung dalam sampel oleh pengaruh suhu karena tidak adanya proses pemanasan dalam ekstraksi [7]. Metode maserasi bisa menjauhi rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil [2]. Maserasi dilakukan menggunakan etanol sebagai pelarut, karena dapat melarutkan hampir semua zat yang bersifat polar, non polar dan semi polar. Dalam proses maserasi dipilih etanol 96% yang bersifat polar, universal dan mudah didapatkan. Sebelum sampel di maserasi, terlebih dahulu dilakukan perajangan sehingga menyebabkan lebih banyak senyawa yang tertarik keluar bersama pelarut, sehingga proses ekstraksi berjalan sempurna, proses penguapan ekstrak menggunakan waterbath pada suhu 60°C hingga menjadi ekstrak kental. Ekstrak kental yang di peroleh adalah 44 gram. Ekstrak dibuat menjadi tiga variasi dosis yaitu: 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB.

Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, mencit putih jantan diaktimalisasi dalam ruangan penelitian selama satu minggu. Hal ini bertujuan sebagai adaptasi lingkungan baru, untuk mengetahui mencit sakit atau tidak sebelum digunakan untuk hewan percobaan, yang tidak menunjukkan penurunan berat badan lebih dari 10% [24].

Sebelum dilakukan uji bersihan karbon (*carbon clearance*) masing-masing hewan uji diberikan perlakuan selama 6 hari berturut-turut. Hal ini bertujuan agar masing-masing sediaan memberikan

efek menstimulasi sistem imun. Pada hari terakhir (hari ke-7) mencit dipuaskan selama  $\pm 18$  jam yang bertujuan agar tidak ada asupan makanan yang dapat mengganggu proses pengujian.

Karbon yang digunakan adalah tinta cina, pemilihan tinta cina karena kestabilannya dalam darah dan tidak menimbulkan penyumbatan pembuluh darah. Selain itu, karbon memiliki karakteristik sebagai antigen karena bersifat asing yang dalam keadaan normal tidak terdapat dalam tubuh. Suspensi karbon dibuat dengan cara tinta pelican (4001 blue) diambil sebanyak 1,6 mL kemudian disuspensikan dengan *Natrium Carboxy Metil Cellulose* 1% ke dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% [14]. Penggunaan suspensi *Natrium Carboxy Metil Cellulose* 1% karena bersifat inert sehingga tidak memengaruhi zat aktif, kejernihannya tinggi dan menghasilkan suspensi yang stabil. Penambahan larutan NaCl fisiologis pada pembuatan suspensi bertujuan agar kondisi sediaan suspensi karbon yang digunakan sama dengan kondisi tubuh hewan uji [15].

Untuk dapat melihat efek fagositosis dari ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) maka dibuat kurva baku antara karbon yang terdapat dalam darah dengan nilai absorbansi, dari kurva tersebut maka diperoleh persamaan  $Y = ax + b$ . Pembuatan kurva baku bertujuan untuk melihat hubungan linier antara kadar karbon dalam darah mencit dengan hasil absorbansinya. Nilai absorbansi didapatkan dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 632 nm. Nilai persamaan regresi linier menunjukkan hubungan linier antara konsentrasi karbon yang terdapat di dalam darah mencit dengan absorbansi, semakin tinggi konsentrasi karbon yang masih tertinggal di dalam darah mencit maka akan semakin tinggi nilai absorbansinya [3].

Sistem imun yang berperan sebagai natural first barrier saat terdapat infasi senyawa asing/organisme adalah makrofag dan sel NK (*Natural killer cell*). Kedua sel imun tersebut dinamakan sel fagosit karena mekanisme kerjanya mempertahankan tubuh melawan infeksi dengan cara fagositosis (menelan senyawa asing). Proses fagositosis antigen oleh APC (*antigen presenting cells*) yaitu makrofag, akan memengaruhi pengaktifan sel T. Sel T merupakan sistem imun adaptif yang berperan sebagai pertama pengaktifkan sel B sebagai precursor pembentukan antibodi. Kedua, sel T akan memproduksi sel T sitotoksik yang melawan langsung sel yang terinfeksi [20].

Senyawa flavonoid dapat merangsang proliferasi sel limfosit, jumlah limfosit T dan meningkatkan aktivitas interleukin-2, peningkatan aktivasi sel efektor seperti limfosit, makrofag yang memproduksi dan melepaskan sitokin, interleukin IL-1;IL-6;IL-12; tumor nekrosis faktor alpha (TNF Alpha). Flavonoid kadar tinggi dapat memodulasi sel leukosit agar lebih aktif melakukan fagositosis terhadap bakteri, sehingga lebih banyak bakteri yang dapat dirusak dan dicerna oleh sel leukosit (Zlizar, 2013).

Respon hewan uji mencit dari pemberian obat atau ekstrak yang dapat disebabkan karena beberapa faktor yang memengaruhi metabolisme obat atau ekstrak yang diberikan. Faktor tersebut antara lain faktor genetik, berat badan hewan uji, perbedaan usia dan makanan [28].

#### f. Analisis Data

Peningkatan indeks fagositosis mencerminkan peningkatan fungsi fagositosis dari makrofag mononuklear dan sistem imun non spesifik. Untuk mengetahui dan menganalisis apakah ada perbedaan yang nyata maka dilakukan uji statistik dengan uji One Way ANOVA. Hasil pengujian ANOVA diketahui tidak terdapat perbedaan aktivitas fagositosis yang bermakna diantara kelompok perlakuan ditunjukkan dari nilai sig.  $0,363 > 0,05$ .

## 4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil kajian yang telah dilakukan, didapat simpulan bahwa ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) mempunyai efek imunomodulator pada mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan dosis sebesar 100, 200 dan 400 mg/KgBB. Dosis yang paling baik dicapai oleh kelompok 5 ekstrak etanol daun sirih hijau dosis 400 mg/KgBB, 6 kali lebih baik dari kontrol positif yang bersifat imunostimulan.

### DAFTAR REFERENSI

- [1] Afifah Rukmini. (2020). Skrining Fitokimia Familia *Piperaceae*. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya (JB&P)*, 7 (1), 28–32.
- [2] Agoes. G. 2007., Teknologi Bahan Alam, ITB Press Bandung.
- [3] Aldi, Y., Oktavia, S., & YenniB, S. (2016). Uji Efek Immunomodulator Dari Ekstrak Daun Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Dengan Metode *Carbon Clearance* Dan Menghitung Jumlah Sel Leukosit Pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Farmasi Higea*, 8 (1), 20–31.

- [4] Arifin, H., Anggraini, N., dan Rasyid, R, 2006, Standardisasi Ekstrak *Etanol Eugenia cumini Merr. J. Sains Tek. Far, 11(2)* Universitas Andalas.
- [5] Atmoko, Tri. (2009). Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Ekstrak Tumbuhan Sumber Pakan Orangutan Terhadap *Larva Artemi salina L. Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam Vol. 6 No.1.*
- [6] Baratawidjaja, K.G., (2000). *Imunologi Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- [7] Bellanti, JA. (1993). *Immunologi III*. Edisi ke-3. Penerjemah Samik Wahab. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- [8] Ciulei, J. (1984). *Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs. Bucharest: Faculty of Pharmacy. Pp. 11-26.*
- [9] Coleman, M.D. (2010). *Factor Effecting Drug Metabolisme. UK: Wiley-BlackWell.*
- [10] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta, Indonesia: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [11] Ding, X. Y., Ji, L., Cheng, X., Su, L. L., Li, L., & Lu, T. L. (2016). Effect of Astragali Radix with different sulfur fumigation technologies on immune function in mice. *China journal of Chinese materia medica, 41(15), 2819- 2823.*
- [12] Dirjen POM. (2000). *Farmakope Indonesia Edisi VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [13] Djauzi S, Djoerban Z. (2003). *Penatalaksanaan Infeksi HIV di Pelayanan Kesehatan Dasar, Pokdisus AIDS FKUI/RSCM dan Yayasan Pelita Ilmu*, Jakarta.
- [14] Faradilla, M., Maria, I, I. (2014). Efek Imunomodulator Polisakarida Rimpang Temu Putih (*Curcuma Zeodoaria (christni) Roscoe*). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.*
- [15] Farmasi, S. S. (2021). Uji Efek Imunomodulator Dari Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) dengan Metoda *Carbon Clereance* Terhadap Mencit Putih Jantan.
- [16] Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua*. Bandung : Penerbit ITB.
- [17] Imron, R., Supriatiningsih, dan Firdaus, S. (2016). *Biologi Dasar Manusia*. Jakarta: CV. Trans Info Media.
- [18] Kresno, B.S. (2010). *Imunologi: Diagnosis dan Proses Laboratorium*. Edisi Kelima. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- [19] Luhurningtyas *et.al.* (2020). Uji Efek Imunomodulator Ekstrak Biji Karika (*Carica pubescens Lenne K. Koch*) terhadap Peningkatan Aktivitas Fagositosis pada Mencit Putih Swiss Webster. *Pharmaceutical and Biomedical Sciences Journal Volume 2 (1), 2020, 27-34.*
- [20] Mahanom, H., A. H. Azizah and M. H. Dzulkifli. (1999). *Effect of Different Drying Methods on Concentrations of Several Phytochemicals in Herbal Preparation of 8 Medicinal PlantsLeaves. Mal. J Nutr. Vol 5: 47-54*
- [21] Margone, T., Spagonoletta, A., Salvatore, R., Magnore, M., Dentamaro, F., Russo, M.A & Jirillo, E., (2018). Olive leaf eextracts act as modulators of the human immune response. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formely Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 18 (1), 85-93.
- [22] Minarno, E.B. (2015). Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavonoid Pada Buah *Carica pubesces Lenne & K. Koch* di Kawasan Bromo, cagar dan dataran tinggi Dieng. *El-Hayyah, 5 (2), 73-82.*
- [23] Putra, Hexy.T.P (2013). *Formulasi dan Uji Efektivitas Sediaan Emulsi Perangsang Pertumbuhan Rambut Ekstrak Seledri (Apium graveolus Linn.)*. Skripsi.
- [24] Sasmito, E. (2017). *Imunomodulator Bahan Alami*. Yogyakarta: Rapha Publishing Hal 3,16.
- [25] Sopiha, B., Muliastari, H., & Yuanita, E. (2019). Skrining Fitokimia dan Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Hijau dan Daun Merah Kastuba (*Phytochemical Screening and Potential Antioxidant Activity of Ethanol Ekstract of Green Leaves and Red Leaves Kastuba* ). *Jurnal Balai Riset Dan Standardisasi Industri Ambon, 17(1), 27-33.*
- [26] Suhirman, S., dan Winarti, C., 2007, *Prospek dan Fungsi Tanaman Obat Sebagai Imunomodulator, Penelitian, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Bogor.*
- [27] Vogel, H.G. (2002). *Drug Discovery and Evaluations Pharmacological Assays*. Germany: *Springe Verlag Berlin Heidelberg.*
- [28] Zalizar, L. (2013). Flavonoids of *Phylanthus Niruri* as Immunomodulators A Prospect to Animal Disease Control, *Journal of Science and Technology, 3(5):529-532.*
- [29] Zilhada, Wiraswati Y. (2012). Uji Efek Imunomodulator Katekin Gambir (*Uncaria gambier Roxb.*) Menggunakan Parameter Bersihan Karbon Secara Invitro. *J Bahan Alam Indones 8(3), pp 181-186.*