

Efek Immunomodulator Ekstrak Etanol Spons *Xestospongia* Sp. Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Pada Mencit Jantan Galur Balb/C

Wahyuni, Mesi Leorita, Adryan Fristiohady, Muhammad Ilyas Yusuf, Fadhliyah Malik, Hendra Febriansyah, Sahidin

Program Studi Farmasi, Universitas Haluoleo Kendari

ABSTRAK

Imunomodulator merupakan bahan yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun. Spons *Xestospongia* Sp. diduga mengandung senyawa-senyawa aktif yang berperan sebagai agen imunomodulator. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. terhadap aktivitas fagositosis makrofag. Sebanyak dua puluh empat ekor mencit jantan galur Balb/C umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram dibagi ke dalam 6 kelompok. Kelompok pertama mendapat pemberian ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. 100 mg/kgBB, kelompok kedua mendapat pemberian ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. 200 mg/kgBB, kelompok ketiga mendapat pemberian ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. 300 mg/kgBB dan kelompok keempat mendapat pemberian ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. 400 mg/kgBB. Kelompok kontrol positif mendapat ekstrak *Phyllanthus niruri* Linn. (Stimuno®) 0,13 mg/gBB dan kelompok kontrol negatif mendapatkan Na-CMC 0,5%. Ekstrak diberikan secara peroral sejak hari pertama hingga ketujuh. Pada hari kedelapan masing-masing mencit diinjeksikan bakteri *Staphylococcus aureus* (SA)

0,5 mL secara intra peritoneal. Aktivitas sel makrofag dihitung dari apusan cairan peritoneum mencit. Peningkatan dosis ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. meningkatkan jumlah aktivitas fagositosis makrofag dari 24,25 % (Na-CMC), 34,25% (100 mg/kgBB), 47,00% (200 mg/kgBB), 59,50 % (300 mg/kgBB) dan 62,75% (400 mg/kgBB). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. memiliki potensi sebagai imunomodulator pada dosis 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB dengan efektivitas yang tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif (Stimuno®) dalam meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag berdasarkan hasil uji statistik *post hoc* TUKEY (sig. > 0,05).

Kata Kunci : Spons *Xestospongia* Sp.; Uji Fagositosis; Makrofag; Imunomodulator.

Penulis Korespondensi :

Sahidin

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi,
Universitas Halu Oleo

E-mail : sahidino2@uho.ac.id

PENDAHULUAN

Sistem imun merupakan kumpulan mekanisme dalam suatu makhluk hidup yang melindunginya terhadap infeksi dengan mengidentifikasi dan membunuh substansi patogen. Sistem imunitas berfungsi untuk mendeteksi bahan patogen, mulai dari virus sampai parasit serta menghasilkan antibodi (sejenis protein yang disebut imunoglobulin) untuk memusnahkan bakteri, virus dan benda asing yang masuk ke dalam tubuh

(Sudiano, 2014).

Sistem imunitas yang terganggu akan menyebabkan pertahanan tubuh ikut menurun sehingga tubuh mudah terserang penyakit. Fungsi Sistem imun yang terganggu dapat ditingkatkan serta dikembalikan fungsinya menjadi lebih baik dengan bantuan zat-zat yang bersifat sebagai imunomodulator.

Imunomodulator adalah suatu senyawa/ substansi/ obat yang dapat memodulasi serta meningkatkan sistem imun tubuh. Sel target dari imunomodulator adalah makrofag, granulosit, limfosit T dan B (Praworo, 2011).

Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman maupun hewan termasuk biota laut. Penemuan senyawa-senyawa bioaktif dari biota laut memiliki potensi sebagai sumber bahan baku obat. Spons *Xestospongia* Sp. merupakan salah satu biota laut dari genus *Xestospongia* yang banyak ditemukan di perairan laut Sulawesi Tenggara (Rachmat dan Rachmaniar, 2007).

Ekstrak dari Spons *Xestospongia* Sp. mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid dan saponin (Intyani, 2014). Senyawa flavonoid dan saponin, berdasarkan uji secara in vitro telah menunjukkan adanya respon imun (Kurnianingtyas dkk., 2013). Penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak metanol spons genus *Xestospongia* menunjukkan adanya aktivitas imunomodulator pada hewan uji tikus dosis 100 mg/kgBB (El-Shitany dkk, 2015). Sehingga, peneliti tertarik melakukan penelitian ini, untuk menguji efek imunomodulator dari ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada mencit jantan galur Balb/C.

METODE PENELITIAN

A. Determinasi Sampel

Sampel yang digunakan dilakukan determinasi untuk memastikan bahwa sampel merupakan sampel yang dimaksud yaitu Spons *Xestospongia* Sp. bukan sampel lain. Determinasi sampel dilakukan di Pusat Penelitian Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Halu Oleo.

B. Penyiapan Sampel

Sampel Spons *Xestospongia* Sp. sebanyak 3,6 kg disortasi basah, dan dipotong-potong kecil kemudian dilakukan ekstraksi.

C. Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi. Sebanyak 3,6 kg potongan kecil Spons *Xestospongia* Sp. dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan direndam dengan menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam (Harborne, 2006). Hasil maserasi kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dari hasil penyaringan kemudian dipekatkan dengan penguapan berputar menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak ditimbang untuk mengetahui bobotnya.

D. Uji Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder

1. Senyawa Flavonoid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl pekat, kemudian ditambahkan 0,2 mg serbuk Mg.

Reaksi positif jika terjadi perubahan warna merah tua atau kuning pada lapisan amil alkohol (Ikalinus dkk., 2015)

2. Senyawa Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna coklat hingga jingga (Ikalinus dkk., 2015)

3. Senyawa Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian dikocok selama ± 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan HCl 2 N. Terbentuknya busa yang stabil berarti positif terdapat saponin (Ikalinus dkk., 2015).

4. Senyawa Tanin

Sampel dididihkan dengan 20 mL air lalu disaring. Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1% dan terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tannin (Ikalinus dkk., 2015).

E. Uji Karakteristik Ekstrak

Karakterisasi ekstrak meliputi penetapan kadar air dan kadar abu.

1. Penetapan Kadar Air

Kadar air ditentukan dengan menimbang 1 g sampel. Sampel dimasukan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam, kemudian dikeluarkan dari oven dan didinginkan dalam desikator selama 30 menit, setelah itu sampel ditimbang. Perlakuan ini

dilakukan beberapa kali hingga berat sampel konstan (Sastrawan dkk., 2013).

2. Penetapan Kadar Abu

Penetapan kadar abu dilakukan dengan pengabuan ekstrak dalam krus di dalam tanur pada suhu 600°C . Hal ini mengakibatkan senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga yang tertinggal hanya unsur mineral atau anorganik. Tujuannya adalah untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Selain itu penetapan kadar abu juga dimaksudkan untuk mengontrol jumlah pencemar benda-benda organik seperti tanah, pasir yang seringkali terikut dalam sediaan nabati (Azizah dan Nina, 2013).

Sebanyak 2 g ekstrak ditimbang dengan seksama ke dalam krus dan ditimbang dahulu (A_0), dipijarkan perlahan-lahan. Kemudian suhu dinaikkan secara bertahap hingga $600 \pm 25^\circ\text{C}$ sampai bebas karbon, selanjutnya didinginkan dalam desikator serta ditimbang berat abu (A_1). Kadar abu dihitung dalam persen terhadap berat sampel awal (Depkes, 2008).

F. Uji Aktivitas Imunomodulator dengan Uji Aktivitas Fagositosis

Hewan uji dikelompokkan menjadi 6 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 5 hewan uji. Kelompok tersebut terdiri dari kelompok perlakuan (dosis 100 mg/kg BB,

dosis 200 mg/kg BB, dosis 300 mg/kg BB, dosis 400 mg/kg BB), kelompok kontrol positif (ekstrak meniran komersial®) dan kelompok kontrol negatif (Na-CMC 0,5%). Perlakuan hewan uji dilakukan setiap 1 hari sekali selama 7 hari secara peroral sesuai dengan volume pemberian. Kelompok I, mencit diberikan ekstrak dosis 100 mg/kgBB. Kelompok II, mencit diberikan ekstrak dosis 200 mg/kgBB. Kelompok III, mencit diberikan ekstrak dosis 300 mg/kgBB. Kelompok IV, mencit diberikan ekstrak dosis 400 mg/kgBB, kelompok V sebagai kontrol positif diberikan Stimuno® yang mengandung ekstrak meniran komersial dosis 0,13 mg/kgBB dan kelompok VI sebagai kontrol negatif yang diberikan Na-CMC 0,5%.

Pada hari ke delapan setiap mencit diinfeksi dengan 0,5 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* secara intra peritoneal, lalu dibiarkan selama satu jam sebelum di bedah. Mencit dianestesi dengan eter lalu dibedah perutnya dengan menggunakan pisau bedah dan pinset steril. Jika ditemukan cairan peritoneum pada perut mencit dalam jumlah sedikit, maka ditambahkan larutan *Phosphat Buffered Saline* (PBS) pH 7,8 steril sebanyak 1-2 mL, digoyang-goyangkan secara perlahan kemudian diambil cairan peritoneum dengan spuit 1 cc. Cairan peritoneal dipulas pada kaca preparat dan difiksasi dengan metanol selama 5 menit, kemudian diwarnai dengan pewarnaan

Giemsa 10%, didiamkan 20 menit dan dibilas dengan air mengalir.

Setelah kaca preparat kering, dilihat di bawah mikroskop menggunakan minyak emersi dengan perbesaran (10x–1000x) (Nugroho, 2012).

G. Menghitung Aktivitas Fagositosis

Aktivitas imunostimulan ditentukan dengan menghitung aktivitas fagositosis sel makrofag peritonium mencit. Nilai aktivitas fagositosis adalah persentase sel makrofag yang aktif melakukan proses fagositosis di antara 100 sel makrofag (Masurin dan Chairul, 2012)

% Aktivitas fagositosis =

$$\frac{\text{jumlah sel makrofag aktif}}{\text{jumlah sel makrofag teramati}} \times 100\%$$

H. Analisis Data

Metode analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode *Analysis of Variance* (ANOVA) *one-way* dengan syarat terdistribusi normal, taraf kepercayaan 95% dan tingkat signifikansi (tingkat kesalahan 5% ($\alpha = 0,05$)). Metode ANOVA *one way* digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. terhadap peningkatan aktivitas fagositosis makrofag. Interpretasi data ANOVA yang diamati yaitu nilai signifikansi (sig).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Sampel

Determinasi Spons *Xestospongia* Sp. dilakukan untuk memastikan kebenaran

sampel yang dimaksud dalam penelitian ini. Determinasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada sampel yang akan diteliti sehingga tidak terjadi kesalahan dalam pengambilan sampel untuk penelitian (Andriyani dkk., 2010). Determinasi sampel dilakukan di Pusat Penelitian Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Halu Oleo. Hasil determinasi menunjukkan bahwa spons yang diteliti adalah Spons *Xestospongia* Sp. (No.086/UN29.12.1.1/PP/2018)

B. Penyiapan Sampel

Sampel Spons *Xestospongia* Sp. yang digunakan diperoleh dari Perairan Laut Soropia, Kabupaten Konawe Sulawesi Tenggara. Spons *Xestospongia* Sp. yang digunakan sebanyak 3,6 kg. Spons *Xestospongia* Sp. yang didapatkan selanjutnya dilakukan sortasi basah untuk membersihkan kotoran atau binatang-binatang yang masih melekat pada permukaan spons. Spons *Xestospongia* Sp. kemudian dipotong kecil-kecil dengan tujuan untuk menambah luas permukaan sampel sehingga ketika diekstraksi pelarut dapat terabsorpsi maksimal ke dalam sampel, sehingga hasil ekstraksi dapat optimal.

C. Ekstraksi

Potongan-potongan kecil Spons *Xestospongia* Sp. yang masih segar dimasukkan ke dalam wadah tertutup sebanyak 3,6 kg. Sampel dimaserasi

selama 3x24 jam, dengan pergantian pelarut tiap 24 jam. Hal ini bertujuan untuk memaksimalkan proses ekstraksi serta waktu maserasi dilakukan selama 3x24 jam karena waktu tersebut dianggap efisien untuk berlangsungnya kontak antara sampel dan pelarut serta menghindari terjadinya penguapan. Pengulangan proses perendaman dalam maserasi dilakukan agar mendapatkan sebanyak mungkin senyawa yang terekstraksi. Setelah proses maserasi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan (Anam dkk., 2013).

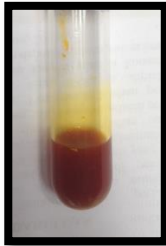



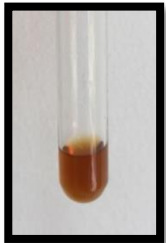
Hasil maserasi yang berupa maserat dipekatkan dengan penguapan berputar menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak cair. Ekstrak cair yang diperoleh dimasukkan dalam cawan porselen yang kemudian disimpan dalam *water bath* pada suhu 50°C. *Water bath* berfungsi untuk menguapkan pelarut etanol sehingga terpisah dari ekstrak hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak Spons *Xestospongia* Sp. yang diperoleh sebanyak 42,53 gram dengan nilai rendamen 1,18%.

D. Uji Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder

Skrining kimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian kimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam sampel yang sedang

diteliti seperti senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan terpenoid. Metode skrining kimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Minarno, 2015). Hasil skrining kimia Spons *Xestopongia* Sp. dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Skrining Kimia Spons *Xestospongia* Sp.

Uji Kimia	Pereaksi	Penanda Positif	Penanda Positif	Kesimpulan
Alkaloid	Dragendorf	Endapan jingga/coklat (Ikalinus dkk., 2015)	Terbentuk endapan coklat merah	Positif 
Flavonoid	Mg + HCl P	Terjadi perubahan warna menjadi merah tua atau kuning pada lapisan amil alkohol (Ikalinus dkk., 2015)	Terbentuk warna merah tua pada lapisan amil alkohol	Positif 
Saponin	HCl 2 N	Gelembung/Busa/Buih (Ikalinus dkk., 2015)	Terbentuk busa yang stabil	Positif 
Tanin	FeCl ₃	Terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Ikalinus dkk., 2015)	Terbentuk warna coklat kehijauan	Positif 
Terpenoid	Liebermann-Buchard	Coklat kemerahan (Setyowati dkk., 2014)	Tidak terbentuk warna coklat kemerahan	Negatif 

E. Uji Karakteristik Ekstrak

Karakterisasi ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. dilakukan sebagai upaya untuk mendapatkan ekstrak yang bermutu baik dan memenuhi standarisasi Materia Medika Indonesia (1989). Karakterisasi yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi parameter non spesifik yaitu penentuan kadar air dan kadar abu yang dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Karakterisasi Ekstrak

Jenis Karakterisasi	Ujukan (%)	Hasil (%)
Kadar Air	<10	6,51
Kadar Abu	<7	7,40

Penetapan kadar air pada ekstrak bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air, terkait dengan kemurnian dan kontaminasi yang mungkin terjadi. Kandungan air yang banyak akan menyebabkan ekstrak cepat ditumbuhi oleh jamur (Saifuddin dkk, 2011). Menurut ditjen POM (1979) kadar air pada ekstrak yang memenuhi persyaratan tidak boleh melebihi 10%. Berdasarkan hasil karakterisasi kadar air ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. adalah 6,51%. Hasil ini telah sesuai dengan persyaratan dimana kadar air untuk ekstrak kental tidak melebihi 10%

Penentuan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal pada ekstrak. Ekstrak dipanaskan pada suhu tinggi hingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap hingga tersisa

unsur mineralnya saja (Anam dkk., 2013).

Menurut Depkes (2008) kadar abu tidak lebih dari 7%. Berdasarkan hasil karakterisasi diperoleh kadar abu dalam ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. sebesar 7,40%. Hasil ini tidak sesuai dengan yang dipersyaratkan dimana kadar abu untuk ekstrak kental tidak melebihi 7%. Hal ini terjadi karena masih terdapatnya kandungan garam yang masih terdapat pada ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp., sehingga kedepannya diperlukan proses ekstraksi yang dapat mengurangi kadar garam yang ada pada ekstrak.

F. Aktivitas Fagositosis

Pengujian efek imunomodulator pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. terhadap peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada hewan uji dengan menggunakan metode perwarnaan Giemsa. Pengujian efek imunomodulator pada penelitian ini dilakukan dengan empat variasi dosis. Pemilihan variasi dosis ini didasarkan pada uji pendahuluan yang telah dilaksanakan pada tanggal 07 September 2017, bertempat di Laboratorium Farmasi UHO. Pada uji pendahuluan digunakan ekstrak etanol spons kelas yang sama yaitu *Demospongiae* dengan dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB.

Berdasarkan uji pendahuluan tersebut dosis 200 mg/kgBB menunjukkan adanya peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit jantan galur Balb/C yang

diinduksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*.

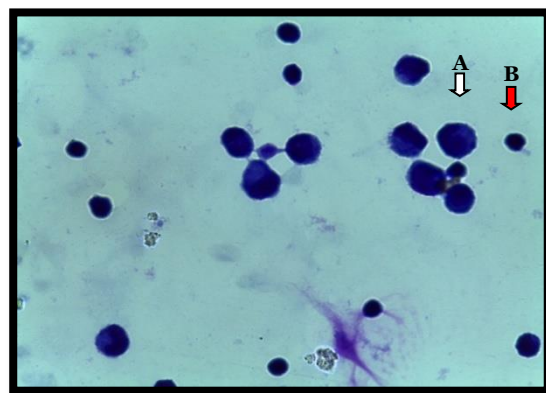
Pemberian ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp., Stimuno®, dan Na-CMC pada hewan uji dilakukan selama 7 hari berturut-turut secara per oral untuk memberikan kesempatan bagi sampel dalam meningkatkan respon imun non spesifik (Aldi dkk., 2013). Pada hari kedelapan setiap mencit diinfeksi dengan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 0,5 mL secara intra peritoneal.

Setelah diinjeksikan dengan suspensi bakteri, seluruh kelompok perlakuan didiamkan selama 1 jam sebelum dilakukan pembedahan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan makrofag dalam mengaktivasi bakteri (Santoso dkk., 2013). Makrofag mampu menahan infeksi selama periode sekitar 1 jam pertama sebelum mekanisme imunitas lain dapat dimobilisasi. Oleh karena itu, pengambilan makrofag dilakukan sekitar 1 jam setelah induksi bakteri, sehingga akan diketahui sejauh mana kemampuan makrofag dalam mengatasi invasi bakteri (Sriningsih dan Wibawa, 2006).

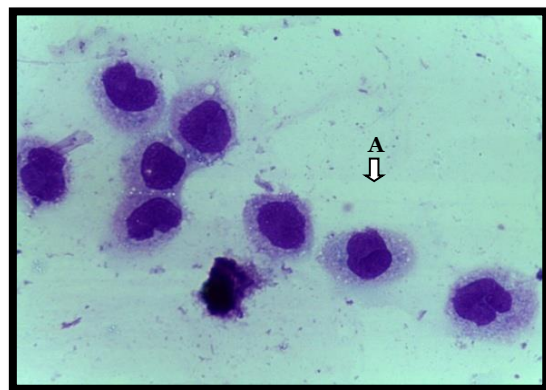
Cairan peritoneum yang diperoleh kemudian dibuat apusan tipis menggunakan kaca preparat, yang selanjutnya dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 1000 kali dengan minyak emersi. Makrofag aktif ditandai dengan bentuk dan ukuran makrofag yang bertambah besar dengan penjurulan pseudopodi yang sangat bervariasi.

Fagosomnya muncul membran yang menjadi lebih berliku-liku, lisosom menjadi lebih banyak, aparat golgi membesar dan retikulum endoplasma kasar berkembang, sedangkan makrofag tidak aktif memiliki bentuk dan ukuran yang lebih kecil dibanding makrofag aktif (Bratawijaya dan Rengganis, 2014). Perbedaan makrofag aktif dan tidak aktif dari 6 kelompok dosis pemberian dapat dilihat pada **Gambar 1**.

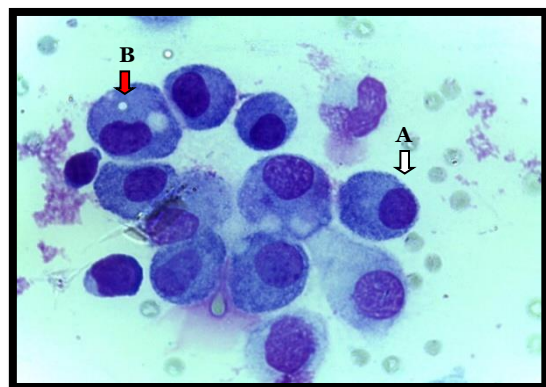
Gambar 1.



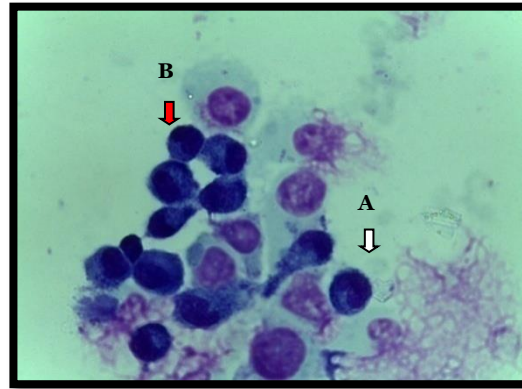
Kelompok I (Dosis 100 mg/kgBB)



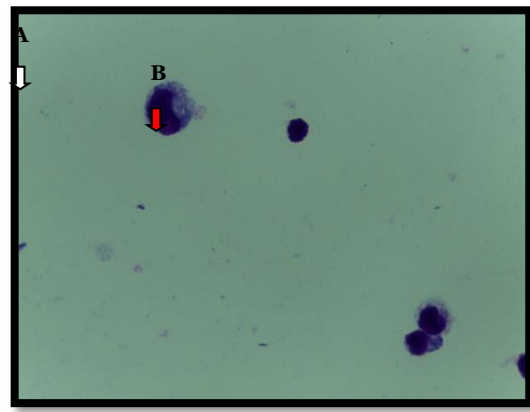
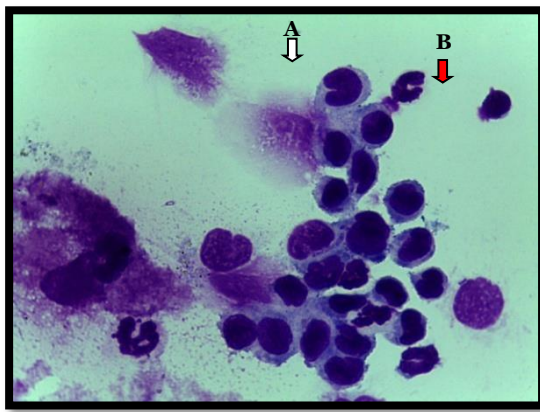
Kelompok II (Dosis 200 mg/kgBB)



Kelompok III (Dosis 300 mg/kgBB)



Kelompok IV (Dosis 400 mg/kgBB)



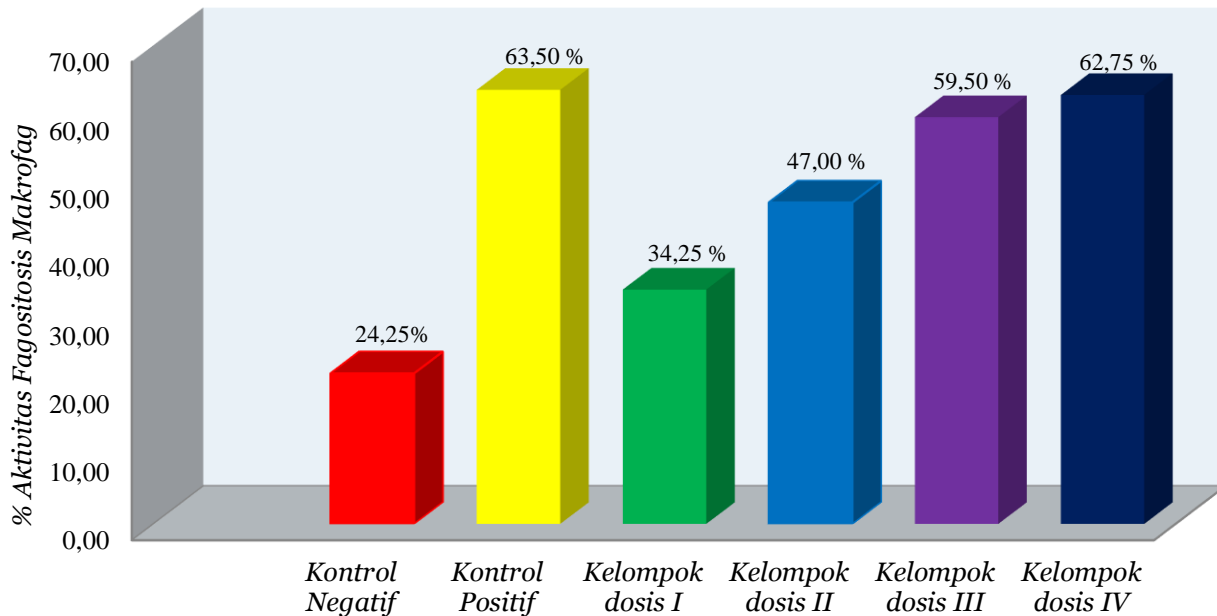
Gambar 1 Apusan Darah Tipis Perbesaran 1000x
(A) Makrofag Aktif dan (B) makrofag Tidak Aktif

Pengujian imunomodulator dilakukan dengan menghitung nilai aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit. Nilai aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit dapat dihitung dari makrofag yang aktif melakukan fagositosis diantara 100 jumlah sel yang dinyatakan dalam bentuk persen dan dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3 Hasil Aktivitas Fagositosis Makrofag Aktif

Kelompok/perlakuan	Jumlah sel yang teraktivasi (%)				Rata-Rata (%)
	1	2	3	4	
Kontrol Negatif (Na-CMC 0,5%)	24	23	25	25	24,25
Kontrol Positif (Stimuno® 0,13 mg/gBB)	60	66	67	61	63,50
Kelompok I (Dosis 100 mg/kgBB)	33	36	29	39	34,25
Kelompok II (Dosis 200 mg/kgBB)	44	47	43	54	47,00
Kelompok III (Dosis 300 mg/kgBB)	57	60	62	59	59,50
Kelompok IV (Dosis 400 mg/kgBB)	59	62	67	63	62,75

Berdasarkan **Tabel 3** diperoleh nilai rata-rata persen fagositosis makrofag dosis 100 mg/kgBB adalah 34,25%, dosis 200 mg/kgBB adalah 47,00%, dosis 300 mg/kgBB adalah 59,50%, dosis 400 mg/kgBB adalah 62,75%, kelompok kontrol positif sebesar 63,50% dan kelompok kontrol negatif adalah 24,25%. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2 Peningkatan Aktivitas Fagositosis Makrofag

Ket:

■ Kontrol Negatif	■ Kelompok II (Dosis 200 mg/kgBB)
■ Kontrol Positif	■ Kelompok III (Dosis 300 mg/kgBB)
■ Kelompok I (Dosis 100 mg/kgBB)	■ Kelompok VI (Dosis 400 mg/kgBB)

Berdasarkan **Gambar 2** dapat dilihat bahwa aktivitas fagositosis makrofag semakin meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak. Pada kelompok kontrol positif memiliki persen aktivitas fagositosis tertinggi sebesar 63,50% diikuti kelompok IV dosis 400 mg/kgBB yaitu sebesar 62,75%, kelompok III dosis 300 mg/kgBB sebesar 59,50%, kelompok II dosis 200 mg/kgBB sebesar 47,00% dan kelompok I dosis 100 mg/kgBB sebesar 34,25%.

Persen aktivitas fagositosis terendah terdapat pada kelompok kontrol negatif yaitu sebesar 24,25%. Hal ini karena kelompok kontrol negatif hanya diberikan Na-CMC 0,5% yang tidak mengandung zat aktif sehingga efek imunomodulator yang ditimbulkan kurang baik. Sementara kontrol positif memiliki aktivitas fagositosis paling tinggi dibandingkan semua kelompok perlakuan.

Hal ini terjadi karena kontrol positif yang berupa stimuno® mengandung

senyawa murni yaitu flavonoid sehingga efek yang ditimbulkan lebih tinggi dibandingkan semua kelompok perlakuan.

Peningkatan fagositosis yang bermakna terdapat pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan. Pada kelompok perlakuan, diberi ekstrak Spons *Xestospongia* Sp. yang diinfeksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga dapat menimbulkan efek fagositosis yang lebih baik. Jumlah makrofag peritoneum yang memfagosit setelah pemberian ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. selama tujuh hari menunjukkan bahwa kelompok perlakuan yang diberi ekstrak Spons *Xestospongia* Sp. lebih tinggi dari pada kelompok yang tidak diberi perlakuan.

Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag yang ditimbulkan pada hewan uji tersebut diakibatkan karena adanya kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak Spons *Xestospongia* Sp. yang diduga dapat meningkatkan sistem imun. Hasil uji skrining kimia menunjukkan bahwa Spons *Xestospongia* Sp. mengandung senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid yang terdapat pada ekstrak Spons *Xestospongia* Sp. dapat meningkatkan sistem imun seluler dengan meningkatkan efektivitas proliferasi limfokin. Flavonoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan

merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis (Chiang dkk., 2003).

Senyawa flavonoid telah terbukti dapat meningkatkan IL-2 dan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit akan mempengaruhi sel CD4⁺, yang akan menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang telah teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Spesific Makrofag Activating Factor*). SMAF (*Spesific Makrofag Activating Factor*) merupakan molekul-molekul multipel, salah satunya adalah IFN- γ . IFN- γ (Interferon- γ) akan mengaktifkan makrofag, sehingga makrofag akan mengalami peningkatan aktivitas fagositosis.

Hal ini akan menyebabkan makrofag dapat membunuh bakteri lebih cepat. Flavonoid juga memiliki mekanisme kerja dengan cara mengaktivasi sel NK untuk merangsang produksi IFN- γ . IFN- γ (Interferon- γ) merupakan sitokin utama MAC (*Macrophage Activating Cytokine*) yang akan mengaktifkan makrofag dan memacu peningkatan aktivitas fagositosis. Makrofag dan neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan beberapa enzim proteolitik di *phagolysosome* seperti *elastase* dan *cathepsin G* yang berfungsi untuk menghancurkan bakteri (Sulistiani dan Hesti, 2015).

Infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* yang diberikan secara intra peritoneal

dapat merangsang makrofag melakukan aktivasi dan bergerak ke sumber infeksi. Makrofag diaktifkan oleh berbagai rangsangan, dapat menangkap, memakan dan mencerna antigen eksogen, seluruh mikroorganisme, partikel tidak larut dan bahan endogen seperti sel penjamu yang cedera atau mati.

Kandungan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri merupakan sinyal bagi makrofag untuk melakukan aktivasi. Aktivasi makrofag ini mempunyai kemampuan yang tinggi dalam melakukan penelanan benda asing melalui proses fagositosis. Sel-sel ini akan menghancurkan semua benda asing seperti kuman, bakteri, sel-sel yang rusak, maupun benda asing lainnya (Besung dkk., 2016).

Sinyal inflamasi yang terjadi akan memicu fagosit seperti makrofag dan neutrofil berikatan dengan dinding pembuluh darah, keluar dari pembuluh darah dan bergerak ke tempat infeksi untuk memakan mikroba penyebab infeksi. Selama proses ini sinyal inflamasi lainnya meningkatkan mobilisasi larut CRP (*C-Reactive Protein*), MBL (*Manan Binding Lectin*) dan komplemen melalui arus darah ke tempat infeksi.

SD (Sel Dendritik) memakan dan memproses komponen mikroba, bermigrasi melalui saluran limfe ke

kelenjar limfoid yang dekat dan mempresentasikan antigen ke sel T. Sel T yang diaktifkan bermigrasi ke tempat infeksi dan memberikan bantuan ke sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag. Sitokin yang diproduksi selama respon non spesifik mendukung dan mengarahkan respon imun spesifik ke tempat infeksi (Bratawijaya dan Rengganis, 2014).

LPS (produk mikroba), IFN (produk sel NK dan sel T), memacu transkripsi gen APC (*Antigen Presenting Cell*) untuk memproduksi IL-12 yang memacu diferensiasi sel CD4⁺ menjadi sel efektor Th1 yang memproduksi IFN- γ . Pada akhirnya akan meningkatkan fagositosis makrofag untuk membunuh mikroba dan merangsang sel B untuk memproduksi IgG yang bekerja sebagai opsonin dalam fagositosis (Bratawijaya dan Rengganis, 2014).

Makrofag secara normal selalu ada di dalam tubuh dan tersebar di berbagai jaringan tubuh seperti paru-paru (makrofag alveolar), jaringan hati (sel Kupffer), ruang sendi (sel sinovial tipe A), sistem saraf pusat (sel Schwann atau mikroglia), ruang serosa (makrofag pleural dan peritoneal) dan jaringan pengikat (histiosit). Populasi makrofag dalam jaringan selain berasal dari monosit juga berasal dari pembelahan makrofag yang belum dewasa. Jumlah makrofag meningkat saat peradangan karena meningkatnya migrasi monosit

dari peredaran darah ke daerah radang (infeksi) (Besung dkk., 2016).

Respon imun selain dipengaruhi oleh infeksi (bakteri, jamur, virus), juga dipengaruhi oleh usia, asupan/status gizi, faktor stress dan sistem endokrin. Faktor-faktor tersebut pada penelitian ini dikendalikan.

Data penelitian ini hanya terbatas pada pengukuran berat badan untuk menentukan dosis intervensi serta penginfeksian bakteri hanya dilakukan selama 1 jam.

Data aktivitas fagositosis dari masing-masing kelompok dilakukan uji homogenitas diketahui bahwa data memiliki karakteristik yang sama (homogen) dan normal (sig >0,05) dengan nilai sig 0,234, sehingga dapat disimpulkan bahwa data aktivitas fagositosis tiap kelompok bervariasi homogen, sehingga dapat dilanjutkan pada pengujian *One Way ANOVA*.

Dilanjutkan dengan pengujian *one-way ANOVA* ditunjukkan bahwa data memiliki nilai sig < 0,05 yaitu sig 0,000. Hal ini berarti bahwa hipotesis H_0 (tidak terdapat perbedaan) ditolak dan hipotesis H_1 (terdapat perbedaan) diterima. Untuk melihat pemberian ekstrak dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, 400 mg/kgBB yang efektif dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag maka analisis statistik dilanjutkan dengan analisis Probabilitas dengan metode Post

Hoc Tukey. Hasil analisis Uji Post *Hoc Tukey HSD* dapat dilihat pada **Tabel 4**.

(I) Perla- kuan	(J) Perla- kuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-39.250*	2.440	.000
	100 mg/kgBB	-10.000*	2.440	.007
	200 mg/kgBB	-22.750*	2.440	.000
	300 mg/kgBB	-35.250*	2.440	.000
	400 mg/kgBB	-38.500*	2.440	.000
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	39.250*	2.440	.000
	Dosis 100 mg/kgBB	29.250*	2.440	.000
	Dosis 200 mg/kgBB	16.500*	2.440	.000
	Dosis 300 mg/kgBB	4.000	2.440	.585
	Dosis 400 mg/kgBB	.750	2.440	1.00 0

Ket. :

Nilai Sig > 0,05 artinya tidak terdapat perbedaan bermakna

Nilai Sig < 0,05 artinya terdapat perbedaan bermakna

Dilanjutkan dengan Uji Post *Hoc Tukey* antara kelompok kontrol negatif dengan perlakuan dan kelompok kontrol positif dan perlakuan. Pada kelompok kontrol negatif dengan perlakuan menunjukkan bahwa pada dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol negatif dengan nilai Sig masing-masing < 0,05 yaitu 0,000 yang artinya pada dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB memiliki

aktivitas yang berbeda bermakna dengan kontrol negatif.

Sedangkan pada kelompok kontrol positif dengan perlakuan menunjukkan bahwa pada dosis 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol positif dengan nilai Sig masing-masing $< 0,05$ yaitu 0,000. Namun pada dosis 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif dengan nilai Sig masing-masing $> 0,05$ yaitu 0,585 dan 1,000 yang artinya pada dosis 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB memiliki aktivitas yang tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif. Namun dosis 400 mg/kgBB menunjukkan peningkatan aktivitas yang lebih baik dibanding dengan dosis 300 mg/kgBB.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol Spons *Xestospongia* Sp. memiliki efek sebagai imunomodulator pada dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada mencit jantan galur Balb/C dengan dosis ekstrak yang efektif sebagai imunomodulator terdapat pada dosis 300 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB dengan rata-rata nilai persen aktivitas fagositosis sel makrofag sebesar 59,50 % dan 62,75%.

Kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol

Spons *Xestospongia* Sp. adalah alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.

DAFTAR PUSTAKA

- Aldi, Y., Nisya, O., dan Dian, H., 2013 Uji Imunomodulator Beberapa Subfraksi Ekstrak Etil Asetat Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) pada Mencit Putih Jantan Dengan Metode Carbon Clearance. *Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik III 2013*
- Anam, S., Muhammad, Y., Alfred T., Nurlina I., Ahmad K., Ramadanil., dan Muhammad S., 2013, Standarisasi Ekstrak Etil Asetat Kayu Sanrego (*Lunasia amara* Blanco), *Online Jurnal of Natural Science*, **2 (3)**.
- Andriyani, D., Pri, I.U., dan Binar, A.D., 2010, Penetapan Kadar Tanin Daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Secara Spektrofotometri Ultraviolet Visibel, *Pharmacy*, **07 (02)**.
- Azizah, B., Nina, S., 2013, Standarisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit, *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, **3 (1)**.
- Besung, N.K., Nyoman, M.A., Ketut, S., dan Ni Ketut, S., 2016, Hubungan Antara Aktivasi Makrofag dengan Kadar Interleukin-6 dan Antibodi Terhadap *Salmonella Typhi* pada Mencit, *Jurnal Kedokteran Hewan*, **10 (1)**.
- Bratawidjaja, K.G., dan Rengganis., 2014, *Imunologi Dasar*, Badan Penerbit Fakultas Ilmu Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta

- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C., 2003. Immunomodulatory Activities Of Flavonoids, Momotertepoids, Triterpenoids, Liriodendrin Glycosides and Phenolic Compounds Of Plantago Species, *Planta Med*, 69:600-604.
- Depkes, 1989, *Materia Medica Indonesia Jilid 5*, Departemen Kesehatan RI : Jakarta.
- Depkes, 2008, *Farmakope Herbal Indonesia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Jakarta
- Ditjen POM, 1979, *Farmakope Indonesia*, Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Jakarta.
- El-Shitany., Shaala., Abbas, A.T., Abdel-dayem, U.A., Azhar, E.I., Ali, S.S., Soest, R.W.M., Youssef, D.T.A, 2015, Evaluation of the Anti-inflammatory, Antioxidant and Immunomodulatory Effects of the Organic Extract of the Red Sea Marine Sponge *Xestospongia testudinaria* Against Carrageenan Induced Rat Paw Inflammation, *PLOS ONE*, **10 (9)**.
- Febriana M.V, 2015, Pengaruh Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan yang Diinduksi Obat Anti Tuberkulosis (Rifampisin dan Isoniazid). Skripsi fakultas kedokteran universitas airlangga.
- Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan, Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Ikalinus, R., Sri, K.W., dan Ni Luh, 2015, Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*), *Indonesia Medicus Veterinus*, **4 (1)**.
- Intyani, W.D., 2014, Kajian Aktivitas Antibakteri dan Metabolit Sekunder Beberapa Jenis Spons, *Skripsi*, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Jurusan Perikanan, Universitas Halu Oleo, Kendari.
- Kurnianingtyas, E., Djati, M.S., dan Rifa'i, M., 2013, Aktivitas Imunomodulator *Polyscias obtusa* Terhadap Sistem Imunitas Pada Bone Marrow Broiler Setelah Pemberian *Salmonella typhimurium*, *Jurnal Exp. Life. Science*, **3 (1)**.
- Masurin, S., Chairul, 2012, Efek Ekstrak Air dan Alkohol pada Siwak (*Salvadora persica* L.) Terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag, *Media Litbang Kesehatan*, **22 (1)**.
- Minarno, E.B, 2015, Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavanoid pada Buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch Di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng, *El-Hayah*, **5 (2)**.
- Nugroho, Y.A., 2012, Efek Pemberian Kombinasi Buah Sirih (*Piper betle* L.) Fruit, Daun Miyana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR.) Leaf, Madu dan Kuning Telur Terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag, *Media Litbang Kesehatan*, **22 (1)**.
- Prashant, 2011, Phytochemical Screening and Extraction, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1 (1)**.
- Praworo., K, 2011, Terapi Medipic Medical Picture, Penebar Plus : Jakarta.
- Rachmat dan Rachmaniar, 2007, *Spons Indonesia Kawasan Timur*, LIPI, *Jurnal Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*, 33:123-138

- Saifuddin, A., Rahayu, V., dan Teruna, HY., 2011, *Standarisasi Bahan Obat Alam*, Graha Ilmu: Yogyakarta.
- Sangi, M.S., Momuat, L.I. dan Kumaunang, M., 2013, Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arange pinnata*), Manado: Universitas Sam Ratulangi.
- Santoso, T.A., Diniatik, Anjar, M.K., 2013, Efek Immunostimulator Ekstrak Etanol Daun Katuk (*Sauropus androgynus* L Merr) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag, *Pharmacy*, **10 (1)**.
- Sastrawan, I.N., Sangi, M., dan Kamu, V., 2013, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Adas (*Foeniculum vulgare*) Menggunakan Metode Dpph, *Jurnal Ilmiah Sains*, **13 (2)**.
- Simaremare, E.S., 2014, Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd), *Pharmacy*, **11 (01)**.
- Srininigsih dan 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.
- Sriwahyuni, I., 2010, Uji fitokimia ekstrak tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn.) dengan variasi pelarut dan uji toksisitas menggunakan brine shrimp (*Artemia salina* Leach.), Skripsi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Sudiano J, 2014, Sistem Kekebalan Tubuh, EGC : Jakarta.
- Sulistiani, R.P., dan Hesti, M.R., 2015, Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta* L Schoot) Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar No (Nitrit Oksida) Mencit Balb/C Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogene*, *Journal Of Nutrition College*, **4 (2)**.