

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Antibodi berperan dalam mempertahankan sistem imun tubuh dari berbagai mikroorganisme. Sistem pertahanan tubuh terdiri dari sistem imun spesifik dan non spesifik. Sistem imun spesifik salah satunya adalah sel limfosit T dan sel limfosit B. Sel limfosit B yang tersensitasi oleh antigen dapat memproduksi antibodi (Kresno, 2010).

Antibodi yang diproduksi pertama kali adalah IgM (Imunoglobulin M). Antibodi IgM berperan sebagai respon awal terhadap masuknya antigen ke dalam tubuh (Schroeder dan Cavacini, 2010). Kadar antibodi IgM akan lebih meningkat pada sensitasi antigen yang kedua, hal ini disebabkan sel B yang memproduksi antibodi membentuk sel memori sehingga mengenal langsung antigen tersebut (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Apabila keseimbangan antibodi dalam mempertahankan sistem imun terganggu maka dibutuhkan suatu agen imunostimulator untuk mempertahankan keseimbangan sistem imun. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas imunostimulator apabila mampu meningkatkan respon imun yang telah tersensitasi oleh antigen (Sternberg dkk., 2009). Senyawa kimia seperti flavonoid, alkaloid dan polifenol mampu meningkatkan respon imun (Rosnizar dkk., 2015).

Indonesia merupakan negara dengan tanah yang subur dimana berbagai jenis tanaman dapat tumbuh dengan baik. Beberapa jenis tanaman dapat

digunakan sebagai peningkat sistem imun seperti *Echinacea purpurea*, mengkudu (*Morinda citrifolia*), serta meniran (*Phyllanthus niruri*) (Suhirman dan Winarti, 2010). Penelitian mengenai peningkatan respon imun yang berasal dari senyawa flavonoid dan alkaloid pernah dilakukan contohnya aktivitas imunostimulan ekstrak etanol daun ranti hitam (*Solanum blumei* Ness ex Blume) dalam peningkatan imunoglobulin titer antiserum kelinci (Simorangkir dkk, 2014). Penelitian lain dari ekstrak daun ciplukan yang mengandung flavonoid mampu meningkatkan titer imunoglobulin M pada mencit (Effendi dan Widiastuti, 2014).

Kedondong merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, dan polifenol. Penelitian yang dilakukan Das, dkk (2011) menyatakan ekstrak etanol kedondong memiliki kandungan senyawa tertinggi yaitu flavonoid dengan persentase sebesar 80,82 %. Flavonoid dalam kedondong ini diharapkan mampu meningkatkan respon imun. Penelitian mengenai kedondong terhadap peningkatan respon imun pernah dilakukan oleh Faizah dan Djati (2014) yang menyatakan flavonoid dalam ekstrak campuran kedondong laut dan tapak liman mampu meningkatkan sel limfosit yang dapat digunakan sebagai agen peningkat respon imun.

Flavonoid diduga mampu meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit (Ukhrowi, 2011). Sel limfosit pada imunitas humoral akan berinteraksi dengan sel B yang berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi dan membentuk sel memori. Sel B yang tersensitasi karena paparan kedua oleh antigen akan menghasilkan antibodi lebih cepat karena sel B memiliki memori pada paparan antigen sebelumnya (Goins dkk., 2010).

Antigen yang mensensitasi sel B dalam produksi antibodi dapat berupa bakteri dan virus (Munasir, 2001). Vaksin merupakan salah satu antigen berasal dari bakteri atau virus yang telah dilemahkan. Vaksin hepatitis B mengandung protein selubung dari hepatitis B yang diproduksi melalui rekayasa genetika (Herawati, 2015). Pemakaian vaksin hepatitis B berperan sebagai antigen yang dapat merangsang respon imun humoral melalui produksi antibodi yang memberikan imunitas (Radji, 2009). Vaksin hepatitis B dapat menginduksi antibodi menjadi lebih aktif dari sebelumnya (Rahayu, 2015; Wahab, 2002). Penelitian ini menggunakan vaksin hepatitis B yang mengandung 10 µg/0,5 ml HbsAg karena lebih aman dibanding dengan virus hepatitis yang aktif.

Penelitian mengenai aktivitas ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz) terhadap peningkatan titer antibodi IgM mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B belum ditemukan, sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi bahan alam dari daun kedondong yang dapat digunakan sebagai agen peningkat titer antibodi IgM.

B. Rumusan masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, dapat disusun rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz) mampu meningkatkan titer antibodi IgM mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B?
2. Senyawa kimia apakah yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz).

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui ekstrak etanol daun kedondong mampu meningkatkan titer antibodi IgM mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B.
2. Mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kedondong.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz) mampu meningkatkan titer antibodi IgM sehingga dapat digunakan untuk peneliti selanjutnya dalam rangka penemuan peningkat respon imun baru dari bahan alam.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz)

a. Deskripsi

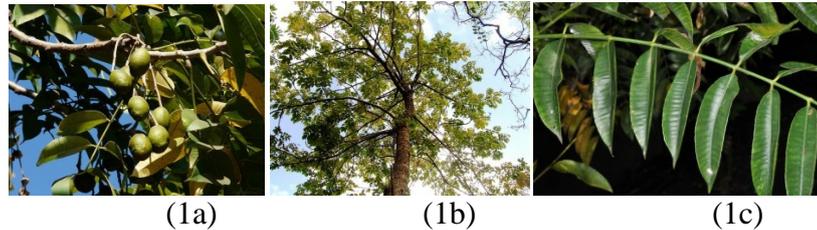
Kedondong merupakan tanaman buah termasuk ke dalam Angiospermae. Kedondong dapat tumbuh subur di daerah tropis. Tanaman ini memiliki banyak nama berbeda di setiap negara seperti ambarella, otaheite apple, hog plum (inggris), kedondong (Indonesia dan Malaysia), hevi (Filipina), gway (Myanmar), dan makak farang (Thailand). Kedondong juga memiliki nama daerah berbeda seperti kedondong (Sunda, Jawa, dan Madura), kacemcem (Bali), inci (Bima dan NTT), karunrung (Makasar), dan dau kaki (Bugis) (Hutapea dan Syamsuhidayat, 1994).

b. Klasifikasi

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Suborder	: Rosidae
Order	: Sapindales
Family	: Anacardiaceae
Genus	: <i>Spondias</i> L.
Spesies	: <i>Spondias pinnata</i> (L.F) Kurz (Tomar dkk., 2013).

c. Morfologi

Kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz) memiliki tinggi ± 20 m dengan batang tegak, bulat, berkayu, permukaan batang halus, percabangan simpodial dimana batang pokok sulit ditentukan. Daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz) berwarna hijau, termasuk tipe daun majemuk yang berbentuk lonjong dengan jumlah ganjil. Letaknya tersebar dengan pangkal runcing, ujung meruncing, pertulangan daun menyirip, tepi daun rata, panjang daun 5-8 cm, dan lebar daun 3-5 cm (Hutapea dan Syamsuhidayat, 1994). Gambar buah, pohon dan daun kedondong dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Buah Kedondong (a); Pohon Kedondong (b); Daun Kedondong (c) (Boradkk., 2014)

d. Kandungan Kimia

Ekstrak metanol daun kedondong mengandung senyawa aktif minyak atsiri, alkaloid, glikosida, steroid, terpenoid, saponin, tanin dan flavonoid sebagai antituberkulosis (Dwijadkk., 2013). Penelitian lain menyebutkan ekstrak etanol daun kedondong dapat sebagai antibakteri dan antifungi karena memiliki kandungan kimia flavonoid, polifenol, tanin, dan saponin (Fitriani dkk., 2013; Trisnawati dkk., 2016).

e. Khasiat Tanaman

Kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz) memiliki manfaat sebagai antioksidan (Maisuthisakul dkk., 2008). Bagian lain yang bermanfaat bagi kesehatan adalah bagian daun. Daun kedondong dapat berfungsi sebagai antioksidan, anti bakteri (Gupta dkk., 2010). Penelitian lain menyebutkan daun kedondong juga berkhasiat sebagai antituberkulosis (Dwijadkk., 2013).

2. Sistem Imun

Sistem imun adalah gabungan sel, molekul, dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi. Sistem imun tubuh diperlukan untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Reaksi yang dikoordinasi sel-sel,

molekul-molekul dan bahan lainnya terhadap mikroba disebut respon imun (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Mekanisme sistem imun dapat dibagi menjadi spesifik dan non spesifik. Sistem imun non-spesifik (*innate* atau *non adaptif*) yaitu sistem imun alamiah yang dibawa sejak lahir, dimana tidak perlu ada pejanan terlebih dahulu dan mekanismenya tidak spesifik. Respon imun non spesifik meliputi infeksi dan fagositosis. Sistem imun spesifik (*adaptif immunity*) yaitu sistem imun yang muncul ketika suatu individu mengalami suatu respon imun. Mekanisme respon spesifik terjadi ketika respon imun non spesifik tidak dapat melindungi tubuh (Sheehan, 1997).

Terdapat dua jenis mekanisme efektor yang menengahi respon imun spesifik, yang pertama antibodi (*humoral immunity*) merupakan produk sel jaringan limfosit, yang kedua imunitas seluler (*cell-mediated immunity*) merupakan limfosit yang tersensitasi spesifik.

Imunitas seluler ditengahi oleh limfosit yang berdiferensiasi dibawah pengaruh timus (*thymus*) atau biasa disebut sel T. Imunitas humoral ditengahi oleh limfosit yang berdiferensiasi di sumsum tulang belakang biasa disebut limfosit sumsum tulang (*bone marrow derived*) atau limfosit B. Elemen sel B (limfosit B dan sel plasma) memproduksi antibodi, baik antibodi yang terikat sel maupun yang disekresi sebagai ekstraseluler (Bellantri, 1993).

3. Antibodi

Antibodi atau imunoglobulin adalah efektor utama dari respon humoral spesifik. Antibodi tersusun atas rantai asam amino (Sheehan, 1997). Antibodi

merupakan molekul atau serum yang diidentifikasi mampu menetralkan mikroorganisme penyebab infeksi. Molekul antibodi dibentuk oleh sel B dalam dua bentuk yang berbeda yaitu sebagai reseptor permukaan antigen dan sebagai antibodi yang disekresikan kedalam cairan ekstraseluler. Antibodi yang disekresikan dapat berfungsi sebagai adaptor yang mengikat antigen melalui binding site-nya yang spesifik, sekaligus merupakan jembatan yang menghubungkan antigen dengan sel-sel sistem imun atau mengaktivasi komplemen (Kresno, 2010).

Antibodi dibagi menjadi lima kelas yaitu IgG, IgM, IgA, IgD, dan IgE. IgG dan IgM berperan dalam sirkulasi dan aktif melawan bakteri ekstraseluler dan virus, sedangkan IgA ada di dalam sekresi mukosa dan aktif pada tempat-tempat tersebut. Antibodi meliputi molekul protein sebanyak 20% yang ada dalam sekresi dan plasma.

Antibodi diproduksi melalui proses yang disebut seleksi klonal (*clonal selection*). Setiap individu memiliki sejumlah besar limfosit B (sekitar 10^7). Suatu antigen akan berinteraksi dengan sel limfosit B yang mempunyai reseptor permukaan yang paling sesuai. Sel B berikatan dengan antigen akan berproliferasi dan membentuk klon sel. Sel-sel B ini akan segera berubah menjadi sel plasma dan mensekresi antibodi yang spesifik terhadap antigen.

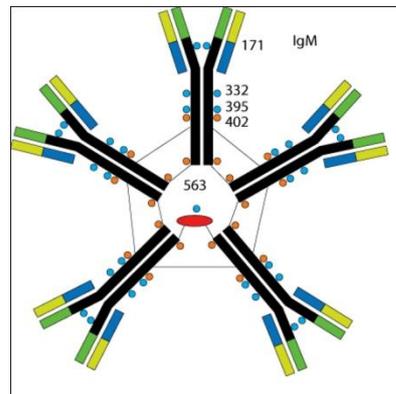
Antibodi secara spesifik akan mengikat antigen baru lain yang sejenis. Apabila serum protein tersebut dipisahkan dengan cara elektroforesis, imunoglobulin ditemukan terbanyak dalam fraksi globulin gamma, meskipun ada beberapa imunoglobulin yang juga ditemukan dalam fraksi globulin alfa

dan beta. Semua antibodi adalah protein yang terdiri dari asam amino dan lima kelas yang berbeda. Kelas ini dibedakan berdasarkan berat molekul, rangkaian asam amino, dan komponen biologis (Sheehan, 1997; Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Dua jenis rantai ringan adalah kappa dan lamda, sedangkan lima rantai berat yang terkandung dalam tiap antibodi menjadi pembeda kelas imunoglobulin (Ig) yaitu gamma yang menandai IgG, alfa menandai IgA, myu menandai IgM, delta menandai IgD dan epsilon menandai IgE. Setiap kelas imunoglobulin dibedakan berdasarkan komponen penandanya (Bellanti, 1993; Sheehan, 1997).

4. Imunoglobulin M

Immunoglobulin M (IgM) adalah antibodi pertama yang dibentuk dalam respon imun. Immunoglobulin M (IgM) mempunyai rumus bangun=pentamer (Gambar 2.) yang terdiri dari 5 unit H_2L_2 yang diikat oleh rantai J (joining, penghubung) pada fraksi fc. Rantai J merupakan polipeptida dengan 137 asam amino yang masuk dalam polimer IgM pada sel penghasil antibodi (Schroeder dan Cavacini., 2010). Sel B umumnya mengandung IgM pada permukaannya sebagai reseptor antigen. IgM dibentuk pertama pada respon imun primer dibandingkan dengan IgG. Kadar IgM yang tinggi merupakan petunjuk adanya infeksi (Subowo, 2010).



Gambar 2. Rumus bangun IgM (Schroeder dan Cavacini., 2010)

Antibodi IgM cenderung lebih reaktif dibandingkan dengan isotipe lain yang memungkinkan sel B untuk merespons dengan cepat berbagai antigen. Antibodi IgM disebut juga antibodi alami karena memiliki afinitas yang relatif rendah. Antibodi alami dapat bereaksi dengan autoantigen, namun jarang bertanggung jawab atas penyakit autoimun, selain itu antibodi alami ini tidak hanya berperan sebagai garis pertahanan pertama, tapi juga berperan dalam imunisasi (Schroeder dan Cavacini., 2010).

Imunoglobulin M hanya dibentuk oleh fetus. Fetus umur 12 minggu sudah mulai membentuk IgM bila sel B nya dirangsang oleh infeksi tertentu seperti sifilis kongenital, rubella, toksoplasmosis dan virus sitomegalo. IgM merupakan aglutinin yang efisien dan merupakan isohemaglutinin alamiah. IgM sangat efisien dalam mengaktifkan komplemen (Darmono, 2006; Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Imunoglobulin M (IgM) merupakan imunoglobulin terbesar. IgM merupakan paling aktif dalam aktivasi komplemen jalur klasik. IgM dapat mencegah gerakan mikroorganisme patogen, memudahkan fagositosis dan merupakan aglutinator poten antigen (Baratawidjaja, 2009).

5. Imunostimulator

Imunostimulator merupakan bagian dari imunomodulator. Imunomodulator adalah obat yang diharapkan dapat mengembalikan dan memperbaiki ketidakseimbangan sistem imun yang fungsinya terganggu. Imunorestorasi dan imunostimulasi disebut imunopotensiasi atau *up regulation*, sedangkan imunosupresi disebut *down regulation* (Baratawidjaja & Rengganis, 2012).

Imunorestorasi ialah suatu cara untuk mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu dengan memberikan berbagai komponen sistem imun, seperti immunoglobulin dalam bentuk ISG, HSG, plasma, plasmapheresis, leukopheresis, transparansi sumsum tulang, hati dan timus (Baratawidjaja, 2009).

Imunostimulan atau imunopotensiasi adalah cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan imunostimulan yaitu bahan yang merangsang sistem imun. Bahan yang disebut imunostimulator yaitu hormon timus, limfokin, interferon, antibodi monoklonal, ekstrak leukosit, bahan asal bakteri dan jamur juga bahan sintetik seperti levamisol, isoprinosin, muramil dipeptida dan lain-lain (Baratawidjaja, 2009).

6. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ELISA merupakan salah satu dari teknik uji imunologi. Prinsip teknik ELISA adalah sama dengan teknik RIA (*Radioimmunoassay*), hanya saja teknik ELISA indikator yang digunakan adalah enzim bukannya radioisotop. Dari hasil reaksi antigen dalam sampel dengan antibodii yang dilabel enzim

(AbE), dengan demikian banyaknya AbE yang terikat pada Ag-AbE sesuai dengan kadar Ag dalam spesimen, maka banyaknya enzim yang terikat pada kompleks dan intensitas warna yang timbul setelah substrat dihidrolisis oleh enzim yang terikat pada kompleks Ag-AbE merupakan ukuran untuk kadar Ag yang diuji (Kresno, 2010). Jenis-jenis ELISA yang biasa digunakan antara lain ELISA langsung, ELISA tidak langsung, ELISA penangkap antigen atau ELISA *Sandwich*, ELISA penangkap antibodi, ELISA kompetitif atau ELISA pemblok.

ELISA yang digunakan pada penelitian adalah jenis ELISA tidak langsung. ELISA tidak langsung merupakan konfigurasi paling sederhana yang dapat digunakan untuk mengukur titer antibodi. Antigen diabsorpsi pada substrat padat. Antibodi primer tidak berlabel dan dapat diperoleh dari serum atau bermacam cairan tubuh lain. Antibodi sekunder terikat pada enzim yang sesuai. Antibodi ini biasanya disebut konjugat. Hasil akan tampak bila ditambah substrat. Kerapatan optik berhubungan dengan konsentrasi antibodi primer (Burgess dan Kusuma, 1995).

7. Levamisol

Levamisol merupakan derivat tetramizol, obat cacing utama untuk *Ascaris lumbricoides*, memiliki sifat imunostimulan yang menyebabkan peningkatan imun. Levamisol mampu meningkatkan proliferasi dan sitotoksitas sel T serta mengembalikan energi pada beberapa penderita kanker. Levamisol dapat meningkatkan efek berbagai bahan seperti antigen,

mitogen, limfosit terutama limfosit T bila hipersensitivitas lambat terganggu (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Levamisol memiliki rumus molekul $C_{11}H_{12}N_2S$, mempunyai berat molekul (BM) 204,3, merupakan serbuk putih hingga mendekati putih, sedikit larut dalam air dan mudah larut dalam alkohol dan metil alkohol. Levamisol hidroklorida adalah levamisol yang ada dalam perdagangan. Levamisol hidroklorida mempunyai rumus molekul $C_{11}H_{12}N_2S.HCl$, mempunyai berat molekul 240,8; merupakan serbuk kristal putih hingga mendekati putih; mudah larut dalam air, larut dalam metanol, praktis tidak larut dalam eter, dan sukar larut dalam metilen klorida (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995).

8. Vaksin Hepatitis B

Vaksin hepatitis B merupakan vaksin virus rekombinan yang telah di-inaktivasi dan non-infectious, berasal dari HbsAg yang dihasilkan dalam sel ragi menggunakan teknologi DNA rekombinan, digunakan untuk imunisasi aktif terhadap infeksi yang disebabkan oleh HBV dan dianjurkan bagi mereka yang memiliki resiko terhadap infeksi oleh virus ini (Tjay dan Rahardja, 2007).

Mekanisme vaksin DNA rekombinan dalam merangsang respon imun adalah setelah plasmid DNA disuntikkan ke dalam jaringan maka plasmid DNA akan bereplikasi secara otonom dan memproduksi antigen yang dikode oleh gen vaksin. Antigen ini langsung dapat menstimulasi sel B yang kemudian dapat memproduksi antibodi terhadap antigen. Vaksin digunakan

sebagai upaya pencegahan penyakit hepatitis B. Vaksin hepatitis B sebagai antigen dapat menginduksi produksi antibodi anti-HBs yang memberikan imunitas terhadap hepatitis B (Radji, 2009).

Produksi anti-HBs dapat ditingkatkan atau diturunkan oleh senyawa aktif yang terdapat dalam bahan alam. Namun, Vaksin hepatitis B diketahui dapat menyebabkan berbagai reaksi yang berbalikan seperti adanya nekrosis pada histopatologinya, sudden death infant syndrome (SIDS), mielitis, multiple sclerosis dan optic neuritis (Sasmito dkk., 2007).

9. Uji Pendahuluan Kandungan Kimia

Uji pendahuluan merupakan pengujian yang bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan kimia yang terkandung dalam simplisia. Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan kandungan kimia pada simplisia. Warna yang dihasilkan pada pengujian menunjukkan adanya kandungan kromofor yang menggambarkan adanya kandungan senyawa spesifik seperti flavonoid, antrakinon, alkaloid, saponin dan sebagainya (Arisandi dan Andriani, 2008).

Tanaman yang mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, kitin, suberin, tanin, dioksiantrakinon, saponin, minyak atsiri, dan minyak lemak perlu dilakukan identifikasi pendahuluan sebelum melakukan isolasi terhadap senyawa kimia yang diinginkan. Identifikasi pendahuluan senyawa kimia dapat diketahui secara kualitatif maupun kuantitatif (Direktorat Jendral Pengawas Obat dan Makanan, 1999).

F. Landasan Teori

Kedondong merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, dan polifenol (Das dkk., 2011). Flavonoid dalam kedondong ini diharapkan mampu meningkatkan respon imun.

Penelitian yang dilakukan oleh Effendi dan Widiastuti (2014) menyatakan kandungan flavonoid di dalam ekstrak etanol daun ciplukan mampu meningkatkan titer imunoglobulin M pada mencit. Flavonoid yang terkandung didalam ekstrak etanol daun kedondong diduga mampu meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit (Ukhrowi, 2011). Sel limfosit pada imunitas humoral akan beriteraksi dengan sel B yang berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi dan membentuk sel memori. Antibodi yang dapat dihasilkan oleh sel B salah satunya adalah IgM. IgM muncul sebagai respon awal setelah adanya paparan antigen seperti vaksin hepatitis B (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Penelitian lain menyatakan flavonoid dalam ekstrak campuran kedondong laut dan tapak liman mampu meningkatkan sel limfosit yang dapat digunakan sebagai agen peningkat respon imun (Faizah dan Djati, 2014). Flavonoid dan alkaloid dalam ekstrak etanol daun ranti hitam (*Solanum blumei* Ness ex Blume) mampu meningkatkan imunoglobulin titer antiserum kelinci (Simorangkir dkk., 2010).

G. Hipotesis

Ekstrak etanol daun kedondong (*Spondias pinnata* (L.F) Kurz) memiliki aktivitas peningkatan titer antibodi IgM mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis serta mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan polifenol.

