

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tubuh manusia akan selalu melakukan pertahanan terhadap berbagai agen infeksi (Roitt, 1997). Agen infeksi seperti bakteri, virus dan parasit (Kresno, 2010) yang menyerang tubuh dapat menyebabkan sistem imun terganggu (Subowo, 1993). Mekanisme pertahanan tubuh terhadap agen infeksi yang masuk ke dalam tubuh terdiri dari spesifik dan non spesifik. Makrofag merupakan salah satu dari sistem imun non spesifik yang akan merespon agen infeksi untuk pertama kalinya (Kresno, 2010). Ketika non spesifik sudah tidak dapat menangani agen infeksi maka sistem imun spesifik yang akan merespon (Munasir, 2001). Sistem imun akan melindungi tubuh dari agen infeksi ketika jumlahnya cukup untuk melawan agen infeksi, tetapi ketika jumlahnya kurang atau tidak cukup untuk melawan agen infeksi, maka tubuh akan terkena penyakit akibat infeksi patogen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Untuk meningkatkan sistem imun yang telah menurun akibat infeksi patogen tersebut maka diperlukan suatu agen imunomodulator (Baratawidjaja, 2002). Agen imunomodulator diperoleh melalui obat-obatan dan bahan alam yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Agen imunomodulator yang berasal dari bahan alam dan termasuk dalam minuman populer di dunia serta paling banyak dikonsumsi adalah teh (Hartoyo,

2003). Seduhan teh hitam terbukti dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Pantas, 2009). Teh hijau terbukti dapat meningkatkan produksi IL-12 dan aktivitas fagositosis makrofag yang diduga berasal dari senyawa flavonoid dan fenolik (Susilaningsih *et al.*, 2005).

Salah satu bahan alam yang juga memiliki potensi sebagai imunomodulator adalah daun sirsak. Dewi dkk., (2013) melaporkan, ekstrak etanol daun sirsak telah terbukti memiliki aktivitas imunomodulator dalam meningkatkan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Kandungan senyawa dalam daun sirsak antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid (Sapri dkk., 2014). Adanya gula yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air (Andersen and Markham, 2006). *Phylanthus niruri* mengandung senyawa flavonoid sebagai imunomodulator (Zalizar, 2013). Ekstrak etanol *Annona muricata* mengandung senyawa flavonoid yang terbukti dapat meningkatkan jumlah sel B220 (Parlinaningrum dkk., 2014). Herba sambiloto (*Andrographis paniculata*, (Burm.F) Nees) memiliki aktivitas sebagai imunostimulator melalui aktifitas fagositosis makrofag (Rahayu, 2014). Flavonoid dapat menimbulkan aktivitas fagositosis yaitu dengan mekanisme flavonoid akan bekerja dengan meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit, yang dapat mempengaruhi sel CD4⁺, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Spesific Makrofag Activating Factor*), yaitu molekul-molekul multipel termasuk IFN γ yang dapat mengaktifkan makrofag (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Senyawa-senyawa lain yang terbukti sebagai imunomodulator dari bahan alam selain flavonoid yaitu triterpenoid pada *Astragalus melanophrurius* (Rios, 2010), alkaloid pada *Swainsonine* (Mohla, 1988) dan *Bougainvillia* (Andayani, 2011).

Induksi vaksin hepatitis B dilakukan untuk merangsang respon imun yang disebabkan oleh kandungan antigen yaitu virus hepatitis B yang telah diinaktifkan (HbsAg) (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Antigen yang terdapat dalam vaksin dapat menyebabkan stimulasi sel untuk menyajikan antigen (APC) kepada sistem imun, dimana dapat melalui berbagai jalur seperti MHC I (*Major histocompatibility complex*) pada sel CD8⁺ atau MHC II pada sel CD4⁺ untuk merangsang makrofag (Radji, 2009).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian seduhan teh daun sirsak yang diuji aktivitasnya terhadap fagositosis makrofag yang diinduksi vaksin Hepatitis B. Uji fagositosis makrofag dilakukan dengan menggunakan metode lateks yaitu menghitung kemampuan sel makrofag mencerna partikel lateks, yang dapat diamati secara manual di bawah mikroskop cahaya (Carballo *et al.*, 1999). Ulfah dan Arifin (2013) melaporkan, bahwa teh hijau mampu meningkatkan fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit. Selain itu, Seduhan teh hitam yang telah diteliti oleh Pantas (2009) terbukti mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Perbedaan teh dan metode penelitian menggunakan kontrol inokulasi dari bakteri *Salmonella thypimurium* yang mendasari penelitian pengaruh pemberian seduhan teh daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag mencit galur Balb/C yang

diinduksi vaksin hepatitis B dengan kontrol positif Imboost guna menjadikannya sebagai tambahan bukti ilmiah mengenai manfaat daun sirsak dalam bidang imunoterapi.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang permasalahan diatas, maka perumusan masalah penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Apakah seduhan teh daun sirsak (*Annona muricata* L.) mempunyai aktivitas fagositosis sel makrofag pada mencit galur Balb/C yang diinduksi vaksin Hepatitis B?
2. Pada dosis berapakah seduhan teh daun sirsak (*Annona muricata* L.) mempunyai aktivitas fagositosis sel makrofag terbesar?
3. Apakah senyawa flavonoid terkandung dalam seduhan teh daun sirsak tersebut melalui identifikasi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas fagositosis sel makrofag dari seduhan teh daun sirsak (*Annona muriccata* L.) pada mencit galur Balb/C yang diinduksi vaksin Hepatitis B.
2. Mengetahui pada dosis seberapa seduhan teh daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang memiliki aktifitas fagositosis sel makrofag terbesar.

3. Mengidentifikasi senyawa flavonoid yang terkandung dalam seduhan teh daun sirsak tersebut dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat yakni:

1. Membuktikan adanya khasiat seduhan teh daun sirsak terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag.
2. Memberikan informasi tentang kandungan senyawa flavonoid dalam seduhan teh daun sirsak tersebut.
3. Memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai bahan obat-obatan alami dalam meningkatkan sistem imun tubuh.

E. Tinjauan Pustaka

1. Teh Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Teh adalah minuman populer didunia dan paling banyak dikonsumsi (Hartoyo, 2003). Teh tidak hanya diproduksi dari daun teh, namun juga dapat dari daun lain seperti daun sirsak. Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tanaman yang berasal dari Amerika Selatan, yaitu Meksiko. Sirsak sering disebut nangka belanda, durian belanda, atau nangka seberang (Sunarjono, 2005).

Teh daun sirsak dibuat dari daun sirsak yang sudah tua untuk mendapatkan khasiat yang optimal. Teh daun sirsak memiliki rasa yang sama dengan teh pada umumnya (Zuhud, 2011).

a. Klasifikasi

Adapun susunan taksonomi tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Sub Divisio : Angiospermae
Ordo : Dicotylidoneae
Class : Ranunculales
Familia : *Annonaceae*
Genus : *Annona*
Species : *Annona muricata* L. (Depkes RI, 2001).

b. Morfologi

Sirsak (*Annona muricata* L.) adalah tanaman buah tropis yang bersifat tahunan (perennial). Umurnya tidak lebih dari 20 tahun. Tanaman sirsak tersebut berbentuk semak dengan tinggi tidak lebih dari 4 meter. Daun sirsak berbentuk bulat panjang dengan ujung runcing. Daun sirsak tebal dan agak kaku dengan urat daun menyirip atau tegak pada urat daun utama. Batang sirsak umumnya kecil, tetapi agak kuat sehingga tidak mudah patah. Bunganya besar, muncul pada bagian ketiak daun, cabang, ranting dan ujung cabang. Buah sirsak umumnya

lonjong, berduri halus dan lunak. Akar tanaman sirsak cukup dalam, dapat menembus tanah sampai kedalaman 2 meter (Sunarjono, 2005).

Gambar daun sirsak terdapat pada gambar 1 sebagai berikut:



Gambar 1. Tanaman Sirsak (Moghadamtousi *et al.*, 2015)

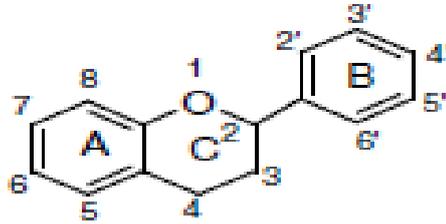
c. Kandungan Kimia

Kandungan senyawa dalam daun sirsak antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid (Sapri dkk., 2014). Flavonoid dari *Phylanthus niruri* merupakan senyawa yang terbukti sebagai imunomodulator (Zalizar, 2013). Flavonoid dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata*, (burm.f) nees) memiliki aktivitas sebagai imunostimulator melalui aktifitas fagositosis makrofag (Rahayu, 2014).

1) Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder (Andersen and Markham, 2006). Senyawa flavonoid adalah senyawa yang memiliki dua cincin benzen yang dipisahkan oleh sebuah unit propana (Brielmannet *al.*, 2004).

Struktur kimia flavonoid terlihat pada gambar 2 di bawah ini:



Gambar 2. Struktur kimia flavonoid (Brielmann *et al.*, 2004).

Flavonoid dalam tumbuhan yang terikat gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid (flavonoid tanpa gula terikat) yang mungkin ada dalam suatu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai gugus hidroksil atau suatu gula, sehingga akan larut pada pelarut polar seperti air, etanol, metanol, butanol, aseton. Adanya gula yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air (Andersen and Markham, 2006).

d. **Khasiat Tanaman**

Tanaman sirsak dipercaya memiliki banyak khasiat seperti antikanker, antitumor, antimikroba, antiparasit dan hipotensi. Daunnya biasa digunakan untuk pengobatan sakit pinggang dan bisul (Latief, 2012). Daun sirsak bermanfaat sebagai antioksidan dan (Kurniasih dkk., 2015), Antibakteri (Hikma, 2015). Ekstrak etanol daun sirsak telah terbukti memiliki aktivitas imunomodulator yang meningkatkan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ (Dewi dkk., 2013), dan meningkatkan jumlah sel B220 (Parlinaningrum dkk., 2014).

2. Sistem Imun

Imunitas adalah perlindungan tubuh terhadap suatu penyakit, khususnya penyakit infeksi (Abbas *et al.*, 2007). Sistem imun adalah gabungan dari sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi. Reaksi yang mengatur sel, molekul dan bahan lainnya disebut respon imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya dari berbagai serangan dalam lingkungan hidup seperti bakteri, virus, toksik, jamur, serta jaringan asing (Baratawidjaja and Rengganis, 2012).

Mekanisme sistem imun dapat dibagi menjadi spesifik dan non spesifik. Sistem imun spesifik yaitu sistem imun yang muncul ketika suatu individu mengalami suatu respon imun. Komponen sistem imun spesifik salah satunya adalah sel limfosit. Sistem imun non-spesifik (*innate* atau *non adaptif*) yaitu sistem imun alamiah yang dibawa sejak lahir, dimana tidak perlu ada pejanan terlebih dahulu dan spesifik (imunitas yang didapat atau adaptif). Komponen sistem imun non spesifik salah satunya adalah makrofag (Virella, 2001).

a. Sel Makrofag

Sel utama yang berperan dalam pertahanan non spesifik adalah sel mononuklear (monosit dan makrofag) serta sel polimorfonuklear (granulosit) (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Sel mononuklear berasal dari sumsum tulang kemudian berdiferensiasi menjadi premonosit yang meninggalkan sumsum

tulang dan masuk ke dalam pembuluh darah yang berdiferensiasi menjadi monosit matang. Selanjutnya monosit bermigrasi diberbagai jaringan untuk berdiferensiasi menjadi makrofag (Abbas *et al.*, 2007). Ukuran makrofag bisa 5-10 kali lebih besar dibanding monosit (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Makrofag ditemukan dalam berbagai jaringan diantaranya sistem saraf pusat disebut sel mikroglia, paru-paru disebut makrofag alveolar, tulang disebut osteoklas, usus disebut makrofag intestinal, kulit disebut sel denditrik, jaringan ikat disebut histiosit, ginjal disebut sel mesangial dan hati disebut sel kupffer (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Makrofag merupakan fagosit penghuni utama jaringan dan rongga serosa seperti pleura dan peritoneum (Playfair and Chain, 2012).

b. Fagositosis Sel Makrofag

Fagositosis adalah proses yang memerlukan pengenalan antigen atau mikroba, menelan mencerna dan degradasi. Fagositosis yang efektif pada invasi kuman dini akan mencegah terjadinya infeksi. Dalam menjalankan proses fagositosis, sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik. Penghancuran kuman terjadi dalam beberapa tingkat sebagai berikut, kemotaksis, menangkap, memakan, fagositosis, memusnahkan dan mencerna (Abbas *et al.*, 2007; Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Kemotaksis adalah gerakan fagosit ke tempat infeksi sebagai respons terhadap berbagai faktor seperti produk bakteri dan faktor biokimiawi yang dilepas pada aktivasi komplemen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

3. Imunomodulator

Obat-obatan atau bahan yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun disebut imunomodulator. Kategori imunomodulator berdasarkan efeknya yaitu imunorestorasi, imunosupresi dan imunostimulasi. Imunorestorasi dan imunostimulasi disebut imunopotensiasi atau *up regulation*, sedangkan imunosupresi disebut *down regulation* (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Imunorestorasi adalah suatu cara untuk mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu dengan memberikan berbagai komplemen sistem imun, seperti imunoglobulin dalam bentuk *immune serum globulin* (ISG), *hyperimmune serum globulin* (HSG), plasma, plasmaferesis, leukoferesis, transplantasi sumsum tulang, hati dan timus. Imunostimulasi adalah cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan imunostimulan yaitu bahan yang merangsang sistem imun seperti hormon timus, limfokin, interferon (biologis), levamisol, isoprinosin, antioksidan (sintetik). Imunosupresan merupakan suatu tindakan untuk menekan respons imun. Kegunaannya di klinik terutama pada transplantasi dalam usaha untuk mencegah reaksi penolakan dan

berbagai penyakit inflamasi yang menimbulkan kerusakan (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Imunomodulator dapat berasal dari bahan alam dan sintetis. Beberapa penelitian mengenai aktivitas imunomodulator yang berasal dari bahan alam seperti pada daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) yang terbukti dapat meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag (Kusmardi dkk., 2007). Umbi iles-iles terbukti dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas fagositosis sel makrofag (Makiyah, 2016). *Aloe vera* terbukti mempunyai efek imunomodulator yaitu meningkatkan aktivitas sel-sel efektor seperti limfosit dan makrofag (Wiedosari, 2007). Imunomodulator yang berasal dari sintetis seperti levamisol, isoprinosin dan muramil dipeptida (Sjahrurachman *et al.*, 2004).

4. Imboost

Imboost mengandung tanaman *Echinaceae purpurea* sebanyak 250 mg, *Zinc picolinate* sebanyak 10 mg, dan dikemas dalam sediaan tablet 500 mg. Imboost berfungsi untuk membantu memperbaiki daya tahan tubuh atau respon imun tubuh, serta untuk terapi pendamping terutama untuk infeksi saluran pernafasan yang berat dan akut. Khasiat *Echinacea* diantaranya sebagian besar bekerja pada sistem imun non spesifik, karena itu mungkin mengatur fungsi imun di dalam alergi dan autoimun, mempertinggi daya tahan pada infeksi, terutama pada bagian

atas pernafasan, membantu dalam penyembuhan dari kemoterapi, dan anti inflamasi (Milss and Bone, 2000).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Prastiwi (2015) menyebutkan bahwa dosis imboost sebesar 0,65 mg / 20grBB / hari dapat bertindak sebagai imunomodulator.

5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan teknik pemisahan utama untuk penelitian kandungan kimia dalam tumbuhan (Hajnos *et al.*, 2007). Kelebihan khas KLT ialah keserbagunaan, kecepatan dan kepekaannya (Harborne, 1987).

KLT melibatkan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai penyerap (kromatografi cair-padat) atau berfungsi sebagai lapisan penyangga untuk lapisan zat cair (kromatografi cair-cair) (Sastrohamidjojo, 2005). Fase diam yang umum digunakan adalah *silica gel*, alumina, kalsium hidroksida, magnesium fosfat, selulosa, pati, poliamida, sephadex (Harborne, 1987). Fase gerak atau campuran pelarut pengembang dapat berupa segala macam pelarut atau campuran pelarut. Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga *Retardation factor* (R_f), berikut adalah rumus harga R_f (Sastrohamidjojo, 2005):

$$R_f = \frac{\text{jarak noda dari tempat penotolan}}{\text{jarak elusi}}$$

6. Induksi Vaksin Hepatitis B

Vaksin digunakan untuk imunisasi aktif terhadap penyakit hepatitis B. Vaksin hepatitis B rekombinan merupakan vaksin virus rekombinan yang telah di-inaktivasi dan *non infectious*, berasal dari HbsAg yang dihasilkan dalam sel ragi menggunakan teknologi DNA rekombinan (Tjay dan Rahardja, 2007).

Pemberian vaksin hepatitis b menyebabkan terjadinya kejadian demam sehingga akan merangsang respon imun yang disebabkan kandungan endotoksin dalam vaksin (Cherry, 1996). Antigen yang terdapat dalam vaksin dapat menyebabkan stimulasi sel untuk menyajikan antigen (APC) kepada sistem imun, dimana dapat melalui berbagai jalur seperti MHC I (*Major histocompatibility complex*) pada sel CD8⁺ atau MHC II pada sel CD4⁺ untuk merangsang makrofag (Radji, 2009).

Produksi vaksin hepatitis B dari jamur dengan teknik rekombinan, merupakan cara yang lebih mudah untuk memproduksi vaksin dalam jumlah besar dan aman dibanding dengan yang diproduksi dari serum (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

F. Landasan Teori

Salah satu bahan alam yang juga memiliki potensi sebagai imunomodulator adalah daun sirsak. Dewi dkk., (2013) melaporkan, ekstrak etanol daun sirsak telah terbukti memiliki aktivitas imunomodulator dalam meningkatkan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Ekstrak etanol *Annona muricata*

terbukti dapat meningkatkan jumlah sel B220 yang berasal dari senyawa flavonoid (Parlinaningrum dkk., 2014). Teh hijau terbukti dapat meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag dan proliferasi sel limfosit (Ulfah dan Arifin, 2013). Pantas (2009) melaporkan, seduhan teh hitam terbukti mampu meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag.

Kandungan senyawa dalam daun sirsak antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid (Sapri dkk., 2014). Adanya gula yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air (Andersen and Markham, 2006). Flavonoid pada *Phylanthus niruri* merupakan senyawa yang terbukti sebagai imunomodulator karena dapat meningkatkan aktivitas fagositosis, kapasitas fagositosis dan titer antibodi (Zalizar, 2013). Rahayu (2014) menambahkan bahwa senyawa flavonoid pada herba sambiloto (*Andrographis paniculata*, (Burm.F) Nees) terbukti memiliki aktivitas sebagai imunostimulator melalui aktifitas fagositosis makrofag. Mekanisme flavonoid dalam aktivitas fagositosis makrofag yaitu akan meningkatkan aktivitas IL-2 dan proliferasi limfosit, yang dapat mempengaruhi sel CD4⁺, kemudian menyebabkan sel Th1 teraktivasi. Sel Th1 yang teraktivasi akan mempengaruhi SMAF (*Specific Makrofag Activating Factor*), yaitu molekul-molekul multipel termasuk IFN γ yang dapat mengaktifkan makrofag (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Pemberian vaksin Hepatitis B akan merangsang respon imun yang disebabkan kandungan antigen dalam vaksin yang dapat menstimulasi APC ke sistem imun melalui berbagai jalur seperti MHC I pada sel CD8⁺ atau MHC II pada sel CD4⁺ untuk merangsang makrofag (Radji, 2009).

G. Hipotesis

1. Seduhan teh daun sirsak (*Annona muricata* L.) mempunyai aktivitas imunomodulator terhadap fagositosis sel makrofag mencit galur Balb/C yang diinduksi vaksin Hepatitis B.
2. Seduhan teh daun sirsak (*Annona muricata* L.) mengandung senyawa flavonoid.

