

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Ketika tubuh tanpa kita sadari terpapar oleh mikroorganisme baik patogen maupun non patogen. Sistem kekebalan tubuh yang akan mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya, seperti virus, bakteri, dan mikroorganisme yang berasal dari lingkungan. Sistem kekebalan tubuh ini terdiri dari dua sistem, yaitu imun alami (non spesifik) dan imun spesifik. Imun non spesifik merupakan pertahanan terhadap mikroorganisme atau benda-benda asing dalam tubuh (Castro *et al*, 2008). Pada sistem imun non spesifik terdapat sel-sel yang berperan salah satunya adalah makrofag. Makrofag berperan untuk memusnahkan kuman/patogen yang akan merusak tubuh baik melalui mekanisme fagositosis langsung maupun melalui mekanisme tak langsung dengan melepaskan sitokin (Wijayanti, 2000).

Agen imunomodulator dapat berasal dari tanaman. Indonesia memiliki kekayaan hayati yang sangat beraneka ragam, menempati urutan kedua dunia setelah Brazil. Sekitar 30.000 jenis tumbuhan obat dimiliki oleh Indonesia. Dengan biodiversitasnya, Indonesia mempunyai potensi yang besar dalam mengembangkan produk herbal sebagai alternatif pengobatan modern. Namun, sumber daya alam ini belum banyak dimanfaatkan secara optimal bagi kepentingan masyarakat. Sekitar 1200 spesies tanaman obat yang dimanfaatkan

dan diteliti sebagai obat. Masih banyak tanaman obat yang belum diteliti dan diuji secara ilmiah (Hembing, 2007).

Salah satu tanaman yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat adalah daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) yang biasanya hanya dikonsumsi sebagai sayuran. Secara tradisional daun kenikir juga digunakan sebagai obat penambah nafsu makan, lemah lambung dan penguat tulang (Sunarni dkk., 2007). Menurut Liliwirianis *et al.*, (2011) Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) diketahui mengandung saponin (batang dan daun), alkaloid (batang dan daun), steroid (batang dan daun), fenol (daun), flavonoid (batang dan daun) dan terpenoid (daun). Ekstrak etanolik daun kenikir mengandung fenolik 18,68% b/b Ekuivalen Asam Galat (EAG) dan flavonoid total sebesar 55,48% b/b Ekuivalen Rutin (ER) (Nurhaeni dkk., 2014).

Senyawa-senyawa kimia yang terkandung pada tanaman dapat meningkatkan aktivitas sistem imun seperti fenolik (Kumar *et al.*, 2011). Senyawa fenolik dan flavonoid merupakan senyawa yang dapat digunakan sebagai imunostimulator, hal tersebut telah dikemukakan Munawaroh dkk (2006) yang menyatakan bahwa senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun sembung bersifat imunostimulator dengan meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit jantan. Senyawa flavonoid dari tumbuhan *Plantago major* L memiliki efek imunomodulator (Chiang *et al.*, 2003). Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi menggunakan etanol 70% dan tetap berada dalam lapisan air setelah dikocok dengan eter. Etanol dapat menarik senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid dan fenolik (Markham, 1988).

Kandungan senyawa flavonoid dan fenolik dapat diidentifikasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis (Harborne, 1996).

Ekstrak etanol daun johar (*Cassia siamea* Lamk.) dapat meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag (Kusmardi dkk., 2006). Ekstrak buah mengkudu (*M. citrifolia*) dapat meningkatkan jumlah IgM, IgG dan dapat memperbaiki sel-sel hati pada mencit yang diinduksi 3 kali dengan vaksin hepatitis B dalam waktu 42 hari (Sasmito dkk., 2007). Menurut khusnawati (2015) pemberian vaksin hepatitis B induksi pertama pada hari ke8 akan muncul respon imun primer, kemudian pemberian vaksin hepatitis B induksi kedua pada hari ke14 akan muncul respon imun sekunder.

Namun belum adanya penelitian yang menggunakan ekstrak etanolik daun kenikir sebagai imunomodulator, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan aktivitas ekstrak etanolik daun kenikir sebagai imunomodulator pada mencit galur *Balb/ C* melalui pengamatan aktivitas fagositosis makrofag.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan diatas, maka perumusan masalah penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) memiliki aktivitas terhadap fagositosis makrofag mencit galur *Balb/C* yang diinduksi dengan vaksin hepatitis B?
2. Apakah ekstrak etanolik daun kenikir mengandung senyawa golongan flavonoid dan fenol melalui identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dirancang untuk :

1. Mengetahui efek ekstrak etanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit galur *Balb/C* yang diinduksi dengan vaksin hepatitis B.
2. Mengidentifikasi kandungan senyawa golongan fenol dan flavonoid dalam ekstrak etanol daun kenikir melalui identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat:

1. Memberikan tambahan pengetahuan pada masyarakat bahwa daun kenikir bukan hanya digunakan sebagai bahan makanan saja tetapi juga sebagai tanaman obat yang memiliki kemampuan dalam meningkatkan respon kekebalan tubuh.
2. Dapat digunakan sebagai acuan dalam penggunaan daun kenikir sebagai agen imunomodulator yang dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan atau formulasi sediaan pada penelitian selanjutnya.

E. Tinjauan Pustaka

1. Kenikir

Daun kenikir merupakan salah satu tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia dan dimanfaatkan untuk sayur atau lalapan. Semua bagian kenikir digunakan untuk beberapa tujuan seperti bahan tambahan

pangan, obat, dan parfum (Cheng *et al.*, 2015).

a. Klasifikasi tanaman

Klasifikasi tanaman kenikir adalah sebagai berikut (Backer and Van Den Brink, 1963):

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida/ Dicotyledoneae

Ordo : Fabales

Famili : Asteraceae

Genus : *Cosmos*

Spesies : *Cosmos caudatus* Kunth.

Tanaman kenikir dapat dilihat pada gambar 1 dibawah ini.



Gambar 1. Tanaman Kenikir (Anonim, 2016)

b. Morfologi tanaman

Tanaman kenikir adalah tanaman yang berasal dari keluarga *esteraceae*, merupakan tanaman perdu dengan tinggi antara 75- 100 cm. Batangnya tegak, segi empat, beralur membujur, dan memiliki bau yang khas. Tanaman ini memiliki daun majemuk, bersilang hadapan, berbagi menyirip, ujung runcing, tepi rata, panjang 15-25 cm dan berwarna hijau. Bunganya majemuk bentuk bongkol, berada di ujung batang dengan panjang tangkai \pm 25 cm, mahkota terdiri dari 8 helai mahkota yang panjangnya \pm 1 cm, berwarna merah, benang sari berbentuk tabung, kepala sari coklat kehitaman, putih berambut, hijau kekuningan, merah. Buahnya keras, berbentuk jarum, ujung berambut, saat masih muda berwarna hijau setelah tua berwarna coklat, sedangkan bijinya keras, kecil, berbentuk jarum, panjang \pm 1 cm, berwarna hitam. Akar tunggang dan berwarna putih (Backer and Bakhulzen, 1965).

Kenikir adalah tumbuhan tahunan yang berbatang pipa dengan garis-garis yang membujur. Tingginya dapat mencapai 1m dan daunnya bertangkai panjang dan duduk daunnya berhadapan, sehingga terbagi menyirip menjadi 2-3 tangkai. Baunya seperti damar apabila diremas. Bunganya tersusun pada bongkol yang banyak terdapat di ujung batang dan pada ketiak daun- daun teratas, berwarna oranye berbintik-bintik kuning di tengah-tengahnya, dan bijinya berbentuk paruh (Backer and Van Den Brink, 1963).

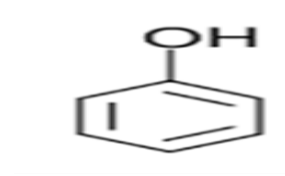
c. Kandungan kimia kenikir

Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) mengandung senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, kuinon dan polifenolat (Safita dkk., 2015). Menurut Nurhaeni (2014) ekstrak etanolik kenikir mengandung fenolik 18,68% b/b Ekuivalen Asam Galat dan flavonoid sebesar 55,48% b/b Ekuivalen Rutin. Menurut Liliwirianis *et al.*, (2011) Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) juga diketahui mengandung saponin (batang dan daun), alkaloid (batang dan daun), steroid (batang dan daun), fenol (daun), flavonoid (batang dan daun) dan terpenoid (daun).

1) Fenol

Senyawa fenol sering berikatan dengan gula sebagai glikosida sehingga menyebabkan fenol cenderung mudah larut dalam air. Senyawa flavonoid dan fenol juga dapat diekstraksi menggunakan pelarut etanol dan etil asetat (Dai *and* Mumper, 2010). Selain itu, fenol dapat menimbulkan kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga membran menjadi rusak pada proses isolasi dan mengakibatkan kerja enzim menjadi terhambat. Sebaliknya adalah pada proses isolasi kepekaan fenol terhadap oksidasi enzim mungkin akan hilang akibat kerja enzim fenolase yang terdapat dalam tumbuhan (Harborne, 1996).

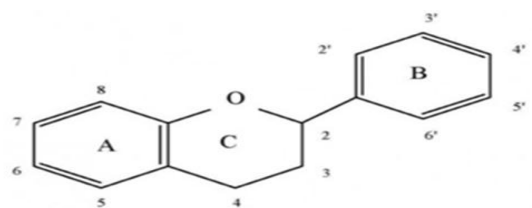
Struktur fenol dapat dilihat pada gambar 2 dibawah ini.



Gambar 2. Struktur Kimia Fenol (Harborne, 1996)

2) Flavonoid

Flavonoid terdapat pada semua bagian tanaman hijau, seperti pada: akar, daun, kulit kayu, benang sari, bunga, buah dan biji buah. Sedangkan pada hewan hanya dijumpai pada kelenjar bau berang-berang, "sekresi lebah" (propolis) dan dalam sayap kupu-kupu (Harborne, 1987). Flavonoid merupakan senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi menggunakan etanol 70% dan tetap berada dalam lapisan air setelah di kocok dengan eter (Harborne, 1996). Pelarut polar seperti etanol, metanol, etilasetat, atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari jaringan tumbuhan (Rijke, 2005). Senyawa flavonoid dan terpenoid dari tumbuhan *Plantago major* memiliki efek imunomodulator (Chiang *et al.*, 2003). Struktur flavonoid dapat dilihat pada gambar 3 dibawah ini.



Gambar 3. Struktur Kimia Flavonoid (Harborne, 1996)

d. Khasiat daun kenikir

Daun kenikir berkhasiat sebagai antibakteri (Safita dkk., 2015), menurunkan kadar asam urat serum tikus putih jantan hiperurikemia dengan dosis 288 mg/200 g BB/hari (Santoso, 2012) dan antioksidan dengan nilai IC_{50} 19,49 μ g/ml (Nurhaeni dkk., 2014).

Ekstrak metanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) memiliki sifat sitotoksik terhadap sel T47D dengan IC_{50} sebesar 344,91 μ g/ml serta memiliki kemungkinan dalam pemacuan apoptosis melalui berbagai macam kemungkinan mekanisme. Potensi ekstrak metanolik daun kenikir dalam memacu apoptosis sel kemungkinan disebabkan oleh senyawa flavonoid dan glikosida kuersetin yang dikandungnya (Pebriana dkk., 2008).

2. Sistem imun

Sistem imun berperan penting untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan dari berbagai bahan dalam lingkungan seperti infeksi akibat paparan virus atau bakteri. Pertahanan imun terdiri dari sistem imun non spesifik dan sistem imun spesifik. Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme sehingga dapat memberikan respon secara langsung (Baratawidjaja, 2002).

Makrofag merupakan salah satu komponen sistem imun non spesifik dan memiliki kemampuan berfagositosis yang berasal dari

sumsum tulang dan bersirkulasi di dalam darah kemudian mengalami diferensiasi menjadi monosit darah dan akhirnya tinggal di jaringan sebagai makrofag dewasa dan membentuk sistem fagosit mononukleus. Sel makrofag merupakan mediator imunitas non spesifik yang paling tua (Gordon, 2010).

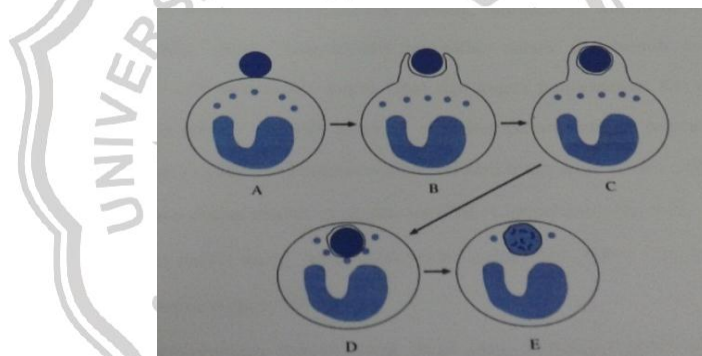
a. Makrofag

Sel mononuklear yang terdiri dari makrofag dan monosit, dan sel polimorfonuklear atau yang disebut juga dengan granulosit merupakan bagian dari sistem imun non spesifik yang berperan utama dalam pertahanan tubuh alamiah. Kemampuan sel makrofag penting dalam menghadapi mikroorganisme patogen maupun sel dan jaringan sendiri yang mengalami kerusakan, sehingga sel makrofag dapat juga dikatakan sebagai *professional phagocytic cell* (Abbas *et al.*, 2007).

Makrofag hidup didalam jaringan-jaringan tertentu dalam tubuh, dapat hidup lama dan memiliki komponen beberapa granul juga dapat melepas bahan antara lain seperti lisozim, komplemen, interferon dan sitokin yang memiliki kontribusi yang cukup penting dalam pertahanan baik sel imun spesifik maupun non spesifik. Partikel antigen sendiri dapat dimakan dan diikat oleh makrofag, adanya makrofag peritoneal dalam cairan peritoneum sepanjang pembuluh kapiler berfungsi untuk menangkap patogen dan antigen yang masuk ke dalam tubuh (Baratawidjaja, 2002).

b. Fagositosis makrofag

Tahapan fagositosis terdiri dari 5 tahapan seperti yang terlihat pada Gambar 4, yang terdiri dari tahapan: Pada gambar (A) adalah tahapan awal dimana antigen (bakteri, virus dan patogen) yang berasal dari luar tubuh bergerak mendekati dan mulai berinteraksi dengan sel makrofag, kemudian antigen akan menempel pada sel makrofag (B). Antigen yang telah menempel kemudian akan ditelan oleh sel makrofag (proses fagositosis) (C), setelah proses fagositosis, maka antigen yang sudah difagosit akan dibunuh (D) dan dicerna oleh sel makrofag (E) (Whei and Louie, 2005).



Gambar 4. Tahapan Proses Fagositosis Makrofag (Whei and Louie, 2005).

3. Imunomodulator

Imunomodulator adalah senyawa tertentu yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non-spesifik, melalui mekanisme pertahanan seluler maupun humoral. Fungsi imunomodulator adalah memperbaiki sistem imun dengan cara mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu (imunorestorasi),

stimulasi (imunostimulan) atau dengan menekan/ menormalkan reaksi imun yang abnormal (imunopresan) (Subowo, 2009).

Obat golongan imunomodulator bekerja menurut 3 cara, yaitu melalui imunorestorasi, imunostimulasi, imunopresi (Baratawidjaja, 2002):

- a. Imunorestorasi ialah suatu cara untuk mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu dengan memberikan berbagai komponen sistem imun, seperti imunoglobulin, interferon, antibodi dan lain- lain.
- b. Imunostimulasi yang juga disebut imunopotensiasi adalah cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang dapat merangsang respon imun disebut imunostimulator.
- c. Imunosupresi merupakan suatu tindakan untuk menekan sistem imun. Kegunaannya diklinik terutama pada transplantasi alat tubuh dalam usaha mencegah reaksi penolakan dan pada penyakit autoimun untuk menghambat pembentukan antibodi. Contoh imunopresan yaitu steroid.

4. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran (Depkes, 2000). Ekstrak sendiri adalah sediaan kental yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia baik simplisia nabati maupun

simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Depkes, 1995).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan 2 metode, yaitu metode dingin dan metode panas. Metode dingin dapat dilakukan dengan cara maserasi dan perkolasi. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang (kamar). Biasanya digunakan untuk mengekstraksi simplisia yang bahan aktifnya mudah larut dalam cairan pelarut, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam pelarut dan tidak tahan panas. Keuntungan cara ini adalah cara pengerjaannya dan peralatan yang digunakan sederhana serta mudah didapat, sedangkan kerugiannya yaitu proses pengerjaannya lama dan proses ekstraksinya kurang sempurna (Depkes RI, 2000).

5. Stimuno

Meniran adalah herba yang berasal dari genus *Phyllanthus* dengan nama ilmiah *Phyllanthus niruri* Linn (Heyne, 1987). Tanaman ini juga berkhasiat sebagai imunodumulator, hal ini terbukti telah dipatenkannya meniran sebagai obat Stimuno® (Sulaksana dkk., 2004).

6. Vaksin Hepatitis B

Vaksinasi hepatitis B berfungsi memberikan perlindungan jangka panjang terhadap infeksi Hepatitis B, dan mungkin seumur hidup untuk pencegahan hepatitis B, dan beberapa akibat serius dari infeksi Hepatitis

B, termasuk kanker liver dan sirosis. Vaksinasi hepatitis B secara rutin pada anak-anak di AS dimulai pada tahun 1991. Sejak saat itu, kasus hepatitis B akut di kalangan anak-anak dan remaja dilaporkan mengalami penurunan hingga lebih dari 95% dan hingga 75% pada semua kelompok usia (Haryati dan Sulistyowati, 2005).

Vaksin hepatitis B diinduksi pada mencit berperan sebagai antigen, sehingga akan merespon pembentukan Imunoglobulin. Induksi bertujuan untuk membangkitkan imunitas yang efektif sehingga terbentuk imunoglobulin dan sel-sel memori. Induksi dilakukan berulang sebanyak tiga kali agar sel-sel memori yang terbentuk semakin banyak (Subowo, 2009). Ekstrak etanol dan ekstrak air dari umbi bawang dayak (*Eleutherine americana* (Aubl) Merr) pada konsentrasi tertentu berpotensi meningkatkan aktivitas imunoglobulin M (IgM) pada mencit (*Mus musculus*) atau sebagai imunostimulan namun efeknya masih rendah dibandingkan dengan kontrol positif (Usmar dkk., 2016). Ekstrak buah mengkudu (*M. citrifolia*), terutama optimal pada ekstrak n-heksana 10%, dapat meningkatkan jumlah IgM, IgG dan dapat memperbaiki sel-sel hati pada mencit yang diinduksi 3 kali dengan vaksin hepatitis B dalam waktu 42 hari (Sasmito dkk., 2007).

7. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan campuran menjadi komponennya berdasarkan perbedaan migrasi masing-masing komponennya dalam fase diam akibat pengaruh dari fase gerak.

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi planar. Fase diam tidak ditempatkan pada kolom tetapi berupa lapisan tipis pada permukaan bidang datar di atas pendukung kaca, alumunium, atau plastik. Sedangkan, fase gerak akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan menarik atau pengaruh gravitasi pada pengembangan menurun (Muhtadi, 2009). Fase diam yang umum digunakan adalah silika gel, alumina, kiselgur dan selulosa. Fase diam berupa silika gel bersifat asam, jika fase diam alumina maka bersifat basa. Fase gerak atau larutan pengembang biasanya digunakan pelarut organik atau bisa juga campuran pelarut organik-anorganik (Gritter *et al.*, 1991).

Identifikasi senyawa yang tak berwarna pada kromatografi dilakukan dibawah lampu UV (254 nm dan 366 nm), ditandai dengan ada atau tidaknya fluoresensi. Untuk menampakkan senyawa yang hampir tidak nampak atau hanya nampak lemah dibawah lampu UV, digunakan bahan penyemprot yang sesuai (Auterhoff dan Kovar, 2002). Identifikasi senyawa lainnya lazimnya menggunakan harga faktor retardasi (R_f) (Sastrohamidjojo, 2005) berikut ini:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid yang telah dilakukan oleh Akbar (2010) pada daun dandang gendis. Hasil penelitian nurhaeni dkk (2014) ekstrak etanolik kenikir mengandung fenolik dan flavonoid.

F. Landasan Teori

Daun kenikir banyak dikonsumsi sebagai sayuran pelengkap pada lalapan dan sebagai antioksidan alami pada masyarakat Sunda (Andarwulan, 2009). Ekstrak etanol daun kenikir mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, kuinon dan polifenolat (Safita dkk., 2015). Daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) sebagai obat tradisional mengandung saponin, flavonoid, polifenol dan minyak atsiri. Akarnya mengandung hidroksieugenol dan koniferil alkohol (Fuzzati *et al.*, 1995).

Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi menggunakan etanol 70% (Harborne, 1996). Etanol dapat menarik senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid dan fenolik (Markham, 1988). Kandungan senyawa flavonoid dan fenolik dapat diidentifikasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis (Harborne, 1996).

Senyawa flavonoid dari tumbuhan *Plantago major* L memiliki efek sebagai imunomodulator (Chiang *et al.*, 2003). Pemberian ekstrak etanolik daun sembung dengan kadar fenolik total berkisar $3,33 \pm 0,085\%$ (b/b) EAG dan aktivitas antioksidan dengan IC_{50} sebesar 59,384 mg/ml dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag peritoneal pada mencit jantan (Munawaroh dkk., 2006). Ekstrak etanol katuk pada dosis 140 mg/kg BB memiliki efek imunostimulator terhadap aktivitas fagositosis makrofag (Santoso dkk., 2013).

G. Hipotesis

Ekstrak etanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) memiliki aktivitas imunomodulator terhadap aktivitas fagositosis makrofag serta mengandung senyawa aktif golongan fenol dan flavonoid.



