

EFEK FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL AKAR PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia*, Jack) TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG SECARA *IN VITRO*

THE EFFECT OF ETHYL ACETATE FRACTION OF ETHANOLIC EXTRACT OF PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia*, Jack) ON MACROPHAGES PHAGOCYTOTIC ACTIVITY *IN VITRO*

Aminda Nur Arifah, Nurkhasanah

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

Jl. Prof. Dr. Soepomo SH, Yogyakarta, Telp. (0274) 379418

Email: nurkhas@gmail.com

ABSTRAK

Eurycoma longifolia adalah salah satu tanaman yang telah digunakan sebagai obat untuk detoksifikasi, afrodisiaka, dan peningkat imunitas serta antikanker. Kuasinoid dari ekstrak akar pasak bumi, memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan imunomodulator melalui peningkatan aktivitas IL-12. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap aktivitas fagositosis makrofag *in vitro*. Makrofag diisolasi dari peritoneum mencit jantan galur Balb/C, kemudian dikultur selama 24 jam. Selanjutnya makrofag diberi perlakuan lipopolisakarida 1%, dimetil sulfoksida, dan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dengan kadar 10, 50, 100 µg/ml. Uji fagositosis dilakukan dengan menambahkan lateks dengan kepadatan 5×10^4 /sumuran dan diinkubasi selama 1,5 jam pada inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Makrofag selanjutnya diwarnai dengan Giemsa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata prosentase aktivitas fagositosis pada perlakuan kadar 10, 50 dan 100 µg/ml, lipopolisakarida, dan dimetil sulfoksida berturut-turut 95,4%, 90%, 85,4%, 83,4%, dan 79%. Rerata kapasitas fagositosis pada perlakuan kadar 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, lipopolisakarida, dan dimetil sulfoksida berturut-turut 469; 439,8; 360,8; 204,6; dan 147,6. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian fraksi etil asetat ekstrak pasak bumi dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag mencit jantan galur Balb/C secara *in vitro*.

Kata kunci: fraksi etil asetat, akar Pasak bumi, fagositosis makrofag, imunomodulator

ABSTRACT

Eurycoma longifolia has been used as a remedy for detoxification, aphrodisiaca, anticancer and immunostimulant. The quassinoids of pasak bumi root extract, have antioxidant activity and immunomodulatory activity by increasing IL-12. This study aims to determine the effect of the ethyl acetate fraction of ethanolic extract of pasak bumi root on macrophages phagocytic activity *in vitro*. Macrophages were isolated from peritoneal fluid of male Balb/C mice, and then were cultured for 24 hours in 24 well plate. The ethyl acetate fraction ethanolic extract of pasak bumi root with concentration of 10, 50, and 100 µg/ml, lipopolysaccharides and dimethyl sulfoxide were added, and incubated for 1.5 hours. The phagocytosis tests was carried out by adding latex with density 5×10^4 /well and incubated for 1.5 hours at incubator (5% CO₂, 37°C). Macrophage were then stained by Giemsa. The results showed that the percentage of active phagocytic cells treated with ethyl acetate fraction of ethanolic extract of pasak bumi root of 10, 50 and 100 µg/ml, lipopolysaccharides, and dimethyl sulfoxide were 95.4%, 90%, 85.4%, 83.4%, and 79% respectively. Phagocytic capacity at treatment levels of 10, 50, and 100 µg/ml, lipopolysaccharides, and dimethyl sulfoxide were 469;

439.8; 360.8; 204.6; and 147.6 respectively. The result showed that treatment of ethyl acetate fraction of ethanolic extract of pasak bumi root can increase the phagocytic activity of macrophages *in vitro*.

Keywords: ethyl acetate fraction, Pasak bumi root, macrophage phagocytic activity, immunomodulator

PENDAHULUAN

Sistem kekebalan tubuh adalah semua mekanisme yang digunakan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya, yang ditimbulkan oleh berbagai bahaya di 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 sebagai efektor pada sistem imun, berperan untuk memusnahkan kuman/patogen yang akan merusak tubuh (Hariyanto, 2000) baik melalui mekanisme fagositosis langsung maupun melalui mekanisme tak langsung dengan melepaskan ROI dan sitokin (Wijayanti, 2000).

Secara empiris pasak bumi adalah salah satu tanaman yang telah digunakan sebagai obat untuk detoksikasi, obat kuat, dan peningkat imunitas serta antikanker (Ang *et al*, 2002). Akar pasak bumi mempunyai kandungan bioaktif yang memiliki efek sebagai antikanker serta kemopreventif dan imunomodulator. Senyawa bioaktif tersebut diantaranya kuasinoid, flavonoid, dan alkaloid (Nurani *et al*, 2010).

Kandungan utama dari kuasinoid adalah eurikomanon. Eurikomanon telah dilaporkan berefek sitotoksik terhadap sel HeLa (sel kanker leher rahim) melalui mekanisme pemacuan p53 (Nurkhasanah and Azimahtol, 2008). Zat bioaktif pasak bumi secara farmakodinamik dan biokimia dapat digunakan sebagai antioksidan, sitotoksik, dan peningkat respon imun (Nurani *et al*, 2010). Aktivitas zat aktif kuasinoid ekstrak akar pasak bumi sebagai antikanker diduga melalui mekanisme pemacuan apoptosis atau penghambatan proliferasi sel kanker dengan melibatkan kerja enzim-enzim antioksidan dan respon imun seluler (Tee and Hawariah, 2006).

Mekanisme kuasinoid sebagai imunomodulator adalah dengan meningkatkan sekresi IL-12 secara *in vitro* (Nurani *et al*, 2010). IL-12 digolongkan dalam mediator respon imun bawaan karena mengaktifasi makrofag terhadap rangsangan mikroba dengan perkembangan fungsi efektor sel NK (Kresno, 2001). Efek biologik IL-12 adalah merangsang produksi IFN- γ oleh sel NK dan sel T serta meningkatkan fungsi sitolitik sel NK dan sel CD8⁺ (Baratawidjaja, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu akar pasak bumi yang diperoleh dari Kalimantan.

Jalannya Penelitian

1. Pembuatan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi

Simplisia akar pasak bumi dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Simplisia distirer selama 3 jam dan selanjutnya didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya maserat disaring menggunakan kain flannel. Maserasi dilakukan berulang dengan tiga kali ulangan agar ekstraksi berlangsung sempurna. Hasil maserasi berupa ekstrak etanol akar pasak bumi, kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak selanjutnya difraksinasi dengan 200 ml etil asetat, kemudian digojog selama 6 jam, lalu didiamkan selama 24 jam. Refraksinasi berlangsung 2 kali. Fraksi yang diperoleh

diuapkan hingga diperoleh fraksi etil asetat kental.

2. Uji fagositosis makrofag

Makrofag diisolasi dari mencit Balb/C yang berumur 1,5 bulan. Mencit dinarkose dengan kloroform dan diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%. Disuntikan 5 ml RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum dan ditunggu selama 3 menit sambil digoyang-goyangkan secara perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara menekan rongga dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat disentrifuse pada 1200 rpm, 4°C selama 10 menit. 100 µl makrofag yang diperoleh diresuspensikan dengan medium komplit sebanyak 900 µl. Jumlah sel dihitung dengan *haemocytometer*, suspensi sel ditumbuhkan dalam *mikrokultur* 24 sumuran yang telah diberi coverslip bulat dandiinkubasi 24 jam. Setelah inkubasi mediadibuang, dan ditambahkan sampel sebanyak 200 mikroliter (2×10^5 sel). Sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit, lalu masing-masing sumuran dicuci dengan 250 µL. Uji fagositosis dilakukan dengan menambahkan 200 µl lateks dalam PBS dengan diameter 3µl. Partikel lateks disuspensikan dalam PBS dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /sumuran. Diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 1 jam. Sel dicuci dengan PBS 3 kali sebanyak 1000 µl/sumuran, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut sebanyak 300 µl/sumuran selama 30 detik. Setelah kering ditambahkan dengan Giemsa 20% masing-masing 1000 µl diamkan pada suhu kamar selama 20 menit. Buang sisa giemsa dan cuci dengan aquades steril. Keringkan pada suhu ruangan, ambil coverslip dari tiap-tiap sumuran dan amati. Persentase sel makrofag yang memfagositosis partikel lateks dihitung dari sekitar 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya pembesaran 400X.

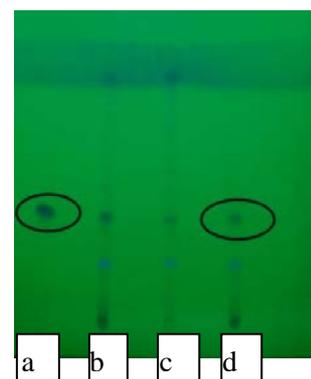
HASIL DAN PEMBAHASAN

Simplisia akar pasak bumi dimaserasi dengan pelarut etanol 96% untuk mengekstraksi zat aktif yang terkandung dalam akar pasak bumi.

Etanol yang bersifat semipolar diharapkan mampu menarik senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran yang optimal yaitu mempunyai kelarutan yang cukup dan kemampuan absorpsi yang optimal untuk menembus membran sel. Hasil maserasi berupa ekstrak etanol akar pasak bumi, kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga dihasilkan suatu ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi dengan 200 ml etil asetat, kemudian digojog selama 6 jam, lalu didiamkan selama 24 jam. Refraksinasi berlangsung 2 kali. Fraksi yang diperoleh diuapkan hingga diperoleh fraksi kental. Cara fraksinasi ini diharapkan mampu melarutkan zat-zat dengan optimal.

Dalam penelitian ini digunakan serbuk akar pasak bumi sebanyak 500,2 gram dan diperoleh ekstrak etanol akar pasak bumi 16,0570 gram. Dari fraksinasi sebanyak 10 gram ekstrak etanol diperoleh fraksi etil asetat akar pasak bumi 2,1 gram.

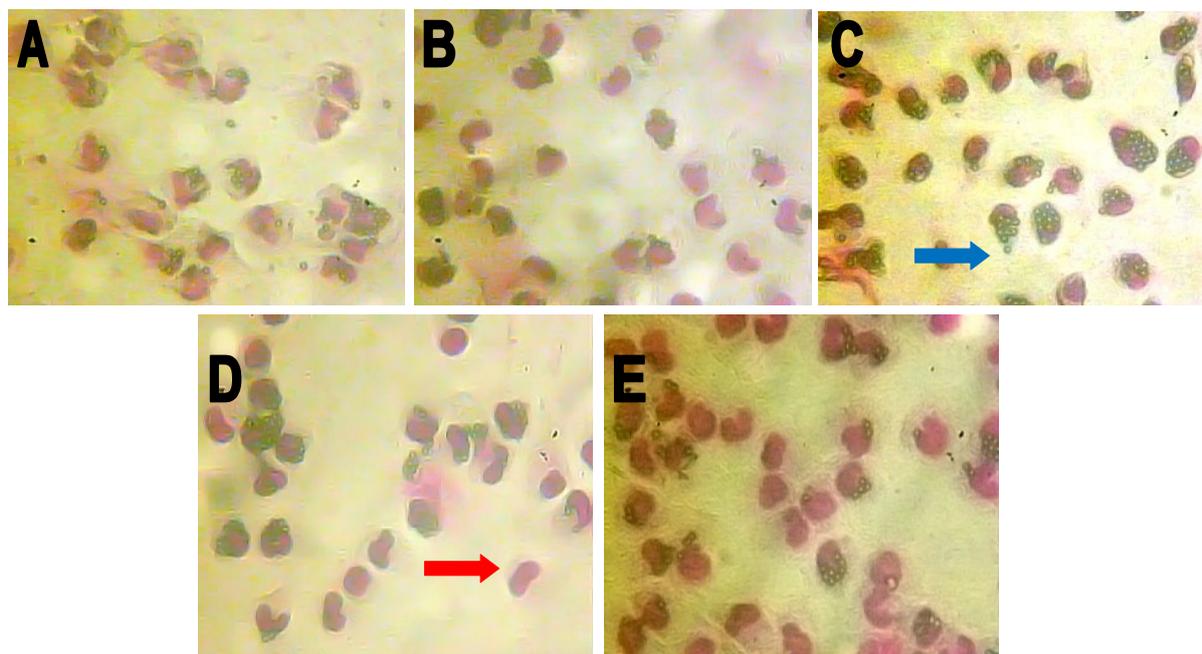
Uji kualitatif dengan KLT (Gambar 1) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi mengandung senyawa eurikomanon. Hasil penelitian menunjukkan sampel dan standar berfluoresensi biru pada UV_{254nm}. Pada UV_{366nm}, sampel berfluoresensi biru sedangkan standar mengalami pepadaman. Baik standar dan sampel memiliki nilai R_f yang sama yaitu 0,55. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi mengandung eurikomanon.



Gambar 1. Profil Kromatografi Lapis Tipis fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi pada a. Standard eurikomanon, b. Ekstrak etanol, c. Fraksi metanol, dan d. Fraksi etil asetat. Standar eurikomanon memiliki R_f 0,05

Uji kemampuan fagositosis non spesifik dilakukan *in vitro* (Leijh *et al*, 1986) dengan menggunakan lateks beads diameter 3 μm (Wijayanti, 1996). Aktivitas makrofag dapat terpacu oleh adanya antigen berupa makromolekul maupun patogen. Immunogenitas suatu substansi dipengaruhi oleh struktur molekul, susunan molekul, cara masuk antigen maupun respon individu terhadap antigen. Lateks juga merupakan makromolekul sehingga dapat dipakai sebagai model untuk memacu aktivitas

makrofag. Selanjutnya kemampuan fagositosis makrofag diukur dengan melihat seberapa besar kemampuan makrofag dalam memakan partikel lateks, yaitu dengan menghitung jumlahnya. Pengamatan dengan mikroskop akan mempermudah membedakan antara lateks yang terfagositosis dengan yang tidak terfagositosis oleh makrofag. Kemampuan fagositosis makrofag pada variasi perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.



Keterangan:

- : Makrofag memfagositosis lateks
- : Makrofag tidak memfagositosis lateks

Gambar 2. Kemampuan fagositosis makrofag akibat perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dilihat dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X, a. DMSO (kontrol negatif), b. LPS (kontrol positif), c. Kadar 10 $\mu\text{g/ml}$, d. Kadar 50 $\mu\text{g/ml}$, dan e. Kadar 100 $\mu\text{g/ml}$

Persentase makrofag yang makan lateks dihitung tiap 100 sel makrofag pada setiap kelompok perlakuan (Chairul dan Praptiwi, 2009) dinyatakan sebagai jumlah sel fagosit aktif (SFA). Harga SFA pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel I.

Hasil menunjukkan bahwa pemberian fraksi etil asetat akar pasak bumi meningkatkan

harga SFA secara bermakna.

Kemampuan fagositosis juga ditunjukkan dengan parameter kapasitas fagositosis makrofag yaitu nilai rerata jumlah lateks yang difagositosis setiap makrofag aktif. Kapasitas fagositosis makrofag pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel II.

Tabel I. Harga SFA setiap kelompok perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi

Perlakuan	Aktivitas Fagositosis					Mean \pm SD
	1	2	3	4	5	
Kontrol negatif (DMSO)	81	78	80	79	77	79 \pm 1,581
Kontrol positif (LPS)	83	82	85	84	83	83,4 \pm 3,36*
Kadar 10 mg/mL	96	96	97	95	93	95,4 \pm 1,517*
Kadar 50 mg/mL	87	90	87	94	92	90 \pm 3,082*
Kadar 100 mg/mL	85	83	88	86	85	85,4 \pm 1,817*

*Menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol negatif

Tabel II. Kapasitas fagositosis makrofag pada perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi pada makrofag peritoneum mencit jantan galur Balb/C

Perlakuan	Kapasitas Fagositosis					Mean \pm SD
	1	2	3	4	5	
Kontrol negatif (DMSO)	149	145	148	149	147	147,6 \pm 1,673
Kontrol positif (LPS)	204	209	207	202	201	204,6 \pm 3,360*
Kadar 10 μ g/mL	466	467	472	471	469	469 \pm 2,550*
Kadar 50 μ g/mL	446	437	442	435	439	439,8 \pm 4,324*
Kadar 100 μ g/mL	366	357	359	358	364	360,8 \pm 3,962*

*menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol negatif

Penelitian yang telah dilakukan oleh Nurani *et al* (2010) menunjukkan bahwa ekstrak etanol pasak bumi memiliki mekanisme pemacu sistem imun dengan immunositokimiawi pada sel T47D, makrofag dan limfosit dengan mengamati ekspresi IL-12.

Protein IL-12 digolongkan dalam mediator respon imun bawaan karena dapat menghubungkan aktivasi makrofag atas rangsangan mikroba dengan perkembangan fungsi efektor sel NK. Pada saat yang sama, IL-12 merupakan mediator yang penting antara imunitas bawaan dengan imunitas spesifik adaptif, dan meningkatkan respons imun spesifik yang mampu melindungi pejamu terhadap produk bakteri dan virus (Kresno, 2001). IL-12 merangsang produksi IFN- γ oleh sel NK dan sel

T serta meningkatkan fungsi sitolitik sel NK dan sel CD8⁺ (Baratawidjaja, 2006).

Pada penelitian ini diperoleh bahwa konsentrasi optimal untuk meningkatkan aktivitas makrofag adalah pada dosis kecil yaitu 10 μ g/ml. Peningkatan dosis menjadi 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml menurunkan kemampuan peningkatan aktivitas. Hal ini mungkin disebabkan karena ekstrak akar pasak bumi pada dosis tinggi sifat sitotoksiknya lebih dominan daripada sifat immunostimulannya sehingga terjadi penurunan efek immunostimulan.

Kajian-kajian yang telah dilakukan oleh Nurani *et al* (2010) menunjukkan bahwa akar pasak bumi potensial untuk dikembangkan sebagai agen immunomodulator. Hasil kajian

tersebut sesuai dengan hasil penelitian efek fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap aktivitas fagositosis makrofag dari cairan peritoneum mencit jantan galur *Balb/C* secara *in vitro*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi memiliki aktivitas fagositosis makrofag dengan meningkatkan jumlah sel fagosit aktif (SFA) dan kapasitas fagositosis

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pemberian fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Pada range kadar yang diuji (10-100 µg/ml) peningkatan tidak menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ang, H.H., Hitotsuyanagi, Y., Fukaya, H. & Takeya, K. 2002. Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Phytochemistry* 59: 833-837.
- Baratawidjaja, KG. 2006. *Imunologi Dasar*. Edisi VII. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Umum Universitas Indonesia. Jakarta.
- Castro A.A., Rodriguez F., De ta F.C., Espinosa L.M., Poveda J.B., Andrada M, Herraes P. 2008. Correlating the Immune Response with the Clinical Pathological Course of Persistent Mastitis Experimentally Induced by *Mycoplasma agalactiae* in Dairy Goats, *Res. Vet. Sci.* 12 (1): 102-111.
- Chairul, dan Praptiwi. 2009. Uji Efektivitas Imunomodulator Tiga Jenis Zingiberaceae Secara In-Vitro Melalui Pengukuran Aktivitas Sel Makrofag dan Kapasitas Fagositosis, *Botani. Puslit. Biologi.*, LIPI, Cibinong.
- Harijanto, P.N. 2000. *Malaria Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis, dan Penanganannya*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Leijh P.C.J., Furth R.V., & Zaet T.L.V., 1986, *In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes* In: Weir DM. Editor. *Cellular Immunology*. Vol 2. London. Blackwell Scientific Publication.
- Nurani, L.H., Akrom, Titik, H. 2010. Kajian Aktivitas Antioksidan Dan Imunomodulator Agen Kemopreventif Sediaan Terstandar Isolat Aktif Kuasinoid Ekstrak Akar *Eurycoma longifolia* Jack, Pada Kanker Payudara Tikus SD Putih (Sprague Dawley) Yang Diinduksi DMBA. *Laporan Penelitian*. LIPI. Jakarta.
- Nurkhasanah M., Azimahtol. 2008. *HLP: Eurycomanone Induces Apoptosis through the Up-Regulation of p53 in Human Cervical Carcinoma Cells*. *Journal of cancer molecules*. 4:109-115.
- Soesanto. 2003. *Workshop Teknologi Dasar Anti Monoklonal*, Laboratorium Ilmu Hayati UGM, Yogyakarta, p.5, 14.
- Tee, T.T. and Hawariah L.P.A. 2005. *Induction of Apoptosis by Eurycoma longifolia Jack Extracts*. *Anticancer Research*. 25: 2205-2214.
- Wijayanti, M. A. 2000. *Sekresi reactive oxygen intermediates oleh makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi selama infeksi Plasmodium berghei*. *BIK*. 32 (2). 77 – 82.
- Wijayanti, M.A. 1996. Peranan Makrofag dalam Imunitas terhadap Infeksi Malaria: Kajian Kemampuan Fagositosis dan Sekresi Reaktif Oksigen Intermediates Makrofag peritoneum Mencit yang Diimunisasi dan Tidak Diimunisasi In Vitro. *Tesis Program Pascasarjana*. UGM. Yogyakarta.