

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara *In Vitro*

(Phagocytic Macrophage Activity of Fractions from Methanolic Leaf Extract of Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) *In Vitro*)

YUSTINA SRI HARTINI^{1,2*}, SUBAGUS WAHYUONO², SITARINA WIDYARINI³,
AGUSTINUS YUSWANTO²

^{1,2}Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

³Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima 25 Mei 2012, Disetujui 11 April 2013

Abstrak: Senyawa imunomodulator dapat diperoleh dari tanaman. Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara tradisional digunakan untuk pengobatan berbagai macam penyakit termasuk untuk meningkatkan daya tahan tubuh. Penelitian ini bertujuan menguji daya imunomodulator ekstrak metanol daun sirih merah dan fraksi-fraksinya, dengan metode fagositosis makrofag secara *in vitro*. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirih merah pada dosis 75µg/mL mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang setara dengan produk-X[®] 100µg/mL yang mengandung ekstrak *Echinacea*. Dari 5 fraksi hasil pemisahan menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat secara kromatografi cair vakum, fraksi II merupakan fraksi paling aktif. Fraksi II mengandung alkaloid dan terpenoid, sedangkan ekstrak metanol selain kedua golongan senyawa tersebut juga mengandung minyak atsiri dan flavonoid. Kemungkinan senyawa dalam daun sirih merah yang bertanggung jawab terhadap aktivitas fagositosis makrofag merupakan golongan alkaloid dan/atau terpenoid.

Kata kunci: sirih merah, *Piper crocatum* Ruiz & Pav., fraksi, ekstrak metanol, fagositosis makrofag, imunomodulator.

Abstract: Plants can be sources of immunomodulatory agents. *Piper crocatum* Ruiz & Pav. (red betel) leaves have been used to heal many diseases, especially to increase endurance. The aim of this research was to investigate the immunomodulatory effect of methanolic leaf extracts of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. and its fractions by *in vitro* phagocytic macrophage activity test. The result showed that methanolic extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. 75µg/mL could stimulate phagocytic macrophage activity equal to 100µg/mL product-X[®] that contained *Echinacea* extract. Separation of the extract by vacuum liquid chromatography using gradient solvent n-hexane - ethyl acetate yielded 5 fractions. The second fraction showed the highest activity. It contained alkaloid and terpenoid, while the extract also contained flavonoid and essential oil. Alkaloid and/or terpenoid could be the compound in the leaves of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. that responsible increasing phagocytic macrophage activity.

Keywords: red betel, *Piper crocatum* Ruiz & Pav., fractions, methanolic extract, phagocytic macrophage, immunomodulator.

* Penulis korespondensi, Hp. 08122968364
e-mail: yustinahartini@usd.ac.id

PENDAHULUAN

SISTEM imun merupakan lini pertama pertahanan tubuh manusia, melindungi tubuh dari penyakit dan mengobatinya apabila telah terjadi penyakit. Alam telah menyediakan banyak sumber obat sejak dahulu kala, dan berbagai senyawa sintetik pun dibuat berdasar model senyawa dari bahan alam. Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman^(1,2). Pengobatan alami merupakan bahan kajian dan sumber penting untuk mendapatkan senyawa obat baru⁽³⁾. Baru sejumlah kecil tanaman yang telah diskriminasi aktivitas imunostimulannya. Dari skrining tersebut terbukti bahwa beberapa tanaman obat memiliki aktivitas imunostimulan, namun tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis, sehingga di masa mendatang penelitian tentang imunostimulator dari tanaman obat sangat bernilai⁽⁴⁾. Ekstrak metanol *Piper betle* L. adalah kandidat baru untuk aktivitas immunosupresif⁽⁵⁾ demikian juga ekstrak metanol *Piper longum*⁽⁶⁾. Beberapa senyawa sejenis terdapat dalam beberapa spesies dalam marga *Piper*⁽⁷⁾.

Tanaman sirih merah mempunyai banyak manfaat dalam pengobatan tradisional, berpotensi menyembuhkan berbagai jenis penyakit⁽⁸⁾. Ekstrak metanol daun sirih merah memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara (T47D) dengan nilai IC_{50} sebesar 44,25 bpj⁽⁹⁾. Fraksi ekstrak etanol daun sirih merah berpotensi sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 33,44 bpj, dan sebagai antikanker terhadap sel *HeLa* dengan nilai IC_{50} sebesar 1197,43 bpj⁽¹⁰⁾. Penelitian ini adalah awal dari penelitian yang bertujuan mencari dan menetapkan struktur kimia senyawa dalam daun sirih yang memiliki daya imunomodulator dengan cara *bioassay guided isolation*. Menurut Ponshe dan Indap⁽¹¹⁾, metode fagositosis adalah salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk skrining bahan aktif yang mempengaruhi respon imun. Pada penelitian ini *bioassay* (uji aktivitas imunomodulator) untuk skrining awal digunakan metode uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan utama berupa daun sirih merah diambil di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T), Karanganyar Jawa Tengah pada bulan Mei 2010. Determinasi tanaman dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Bahan lain adalah media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (Sigma),

fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL), natrium bikarbonat ($NaHCO_3$) (Sigma), L-Glutamin, penisilin, dan streptomisin (Gibco), fungison (Gibco), Dimetilsulfoksida (DMSO), *phosphate-buffered saline* (PBS), kloroform (Merck), metanol (Merck), *latex beads* (Sigma) diameter 0,3 μ m, cat Giemsa 10%, *tryphan blue*, dan Produk-X[®] (kaplet Imboost Force PT Kimia Farma). Hewan uji mencit BALB/c jantan dengan berat 25-35 g (berumur 8 minggu). Kelaikan etik diproses dan mendapat persetujuan dari komisi *ethical clearance* untuk penelitian praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM.

Alat. Timbangan analitik (Sartorius), blender (Retsch bv), maserator (Siemens Schuckert yang dimodifikasi), *rotary evaporator* (Janke and Kunkel Ika Labortechnik), *water bath* (Labeco), oven (Mettler), *vortex mixer* (Janke and Kunkel Ika Labortechnik), sentrifus (Hettich FBA 88), *microplate 24 well* (Iwaki), *coverslips* bulat diameter 13 mm (Nalge Nunc International), inkubator CO₂ (Heraeus), *laminar air flow* (Nuair), mikroskop cahaya (Olympus), kamera digital (Nikon Coolpix L19), hemositometer (Newbauer).

METODE. Ekstraksi. Daun sirih merah dicuci di bawah air mengalir hingga bebas kotoran, kemudian dikeringkan dalam oven suhu 50°C sampai kering. Daun kering dibuat serbuk, ditimbang, dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan metanol ke dalam maserator sampai semua serbuk terendam, kemudian dibiarkan semalam disertai pengadukan. Maserat dipisahkan dan ditampung sedangkan ampas dimaserasi 2 kali lagi dengan pelarut yang sama. Maserat dari 3 kali maserasi dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol kental.

Fraksinasi ekstrak metanol daun sirih merah. Fraksinasi awal dilakukan secara partisi menggunakan pelarut metanol 60%. Sebanyak 10 mL metanol 60% ditambahkan pada 2 gram ekstrak, dicampur menggunakan *vortex mixer* kemudian disentrifus sehingga didapat fraksi larut metanol 60% (FTL) dan fraksi tak larut metanol 60% (FL). Kedua fraksi diuji aktivitas imunomodulasi secara *in vitro* dengan uji aktivitas fagositosis makrofag dengan *latex beads*. Fraksi yang memiliki aktivitas imunomodulasi difraksinasi lebih lanjut dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) / *vacuum liquid chromatography*⁽¹²⁾. Sebanyak 10 gram silika gel 60 ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam cawan porselen berisi 2 gram FTL yang ditetesi eter sedikit demi sedikit sehingga diperoleh campuran yang homogen dan kering (*free flowing*). Pembuatan kolom dilakukan dengan memasukkan

sebanyak 50 gram silika gel sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* sambil divakum untuk memperoleh massa fase diam yang kompak dan padat. Serbuk ekstrak *free flowing* dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* di atas fase diam dengan permukaan atas diusahakan rata sambil divakum. Bagian atas ditutup dengan 2 lembar kertas saring sebesar diameter kolom. Fraksinasi dilakukan dengan menuang pelarut secara perlahan-lahan pada permukaan kertas saring sambil divakum. Pelarut yang digunakan berturut-turut n-heksana, n-heksana - etil asetat (9:1), n-heksana - etil asetat (8:2), n-heksana - etil asetat (7:3), n-heksana - etil asetat (6:4), n-heksana - etil asetat (5:5), n-heksana - etil asetat (4:6), n-heksana - etil asetat (3:7), n-heksana - etil asetat (2:8), n-heksana - etil asetat (1:9), dan etil asetat. Hasil fraksinasi ditampung dalam cawan porselen, setelah kering fraksi-fraksi yang didapat ditimbang, kandungan senyawa didalamnya diperiksa dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

Isolasi dan kultur sel makrofag peritoneal.

Mencit sebanyak 8 ekor dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform. Seluruh tubuh mencit dibersihkan dengan alkohol 70%. Kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneum dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 10 mL medium RPMI 1640 ke dalam rongga peritoneum, ditunggu sekitar 3 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan-lahan. Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diambil dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Aspirat yang didapat disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 3 mL medium RPMI komplit (mengandung FBS 10%) pada pellet yang didapat. Jumlah sel yang didapat dihitung dengan menggunakan hemositometer kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /mL. Suspensi sel yang telah dihitung dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran 200 μ L (5×10^5 sel). Diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit. Medium RPMI komplit ditambahkan 1 mL/sumuran dan diinkubasi lagi selama dua jam. Sel dicuci dengan RPMI dua kali kemudian ditambahkan medium komplit 1 mL/sumuran, kemudian inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

Uji aktivitas fagositosis. *Latex beads* diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /mL. Media diambil dengan cara menyedot media sehingga tinggal makrofag dalam *coverslips*. Pada tutup *plate* diberi identitas sesuai

bahan uji yang akan dimasukkan dalam sumur yang bersangkutan. Pada sumur ditambahkan masing-masing 1 mL bahan uji dalam media RPMI komplit, yakni ekstrak metanol *Piper crocatum* kadar 75 μ g/mL dan 150 μ g/mL, kontrol positif (Produk-X® 100 μ g/mL), kontrol media, dan kontrol pelarut (DMSO 0,15%), secara *triplo* (3 *coverslip*) kemudian diinkubasi selama 4 jam. Setelah 4 jam, suspensi latex beads ditambahkan dalam PBS, dimana latex beads dengan diameter 0,3 μ m sebanyak 400 μ L dengan kepadatan latex beads dalam $2,5 \times 10^7$ /mL, kemudian inkubasikan dalam inkubator CO₂ selama 60 menit. Media diambil dengan cara disedot dan dicuci dengan PBS tiga kali untuk menghilangkan latex beads yang tidak terfagositosis, kemudian dikeringkan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Selanjutnya metanol dibuang dan ditunggu hingga kering kemudian dicat dengan Giemsa 20% selama 30 menit, kemudian dicuci dengan akuades sampai bersih (4-5 kali, akuades menjadi jernih) diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu ruangan. Makrofag yang memfagositosis partikel lateks dihitung dengan cara diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x^(13,14,15,16), masing-masing pada 2 bidang pandang untuk setiap *coverslip*.

Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Aktif.

Skrining fitokimia dilakukan secara uji tabung⁽¹⁷⁾ serta KLT⁽¹⁸⁾ digunakan untuk uji kualitatif terhadap ekstrak dan fraksi aktif.

Identifikasi flavonoid. Ekstrak dilarutkan dalam metanol 50% panas, kemudian ditambahkan logam Mg dan HCl pekat (45 tetes). Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

Identifikasi tanin. Ekstrak metanol (0,5-1 mL) dilarutkan dalam air (1-2 mL) kemudian ditambahkan larutan besi III klorida (FeCl₃) (kuning cerah, 2-3 tetes). Timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekol. Secara KLT dengan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam, n-butanol - asam asetat - air (4:1:5 v/v/v) sebagai fase gerak, adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru pada sinar tampak setelah kromatogram disemprot dengan pereaksi FeCl₃, menunjukkan adanya tanin.

Identifikasi alkaloid. Ekstrak metanol (20 mL) ditambah asam hidroklorida 10% (5-10 mL) kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung, 1 tabung ditetesi 2-3 tetes reagen Mayer's atau Bertrand's, 1 tabung sebagai pembanding. Endapan berwarna kuning keputihan menunjukkan keberadaan alkaloid. Secara KLT dengan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam,

n-heksana-dietilamin (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau kuning pada sinar UV 365 nm setelah kromatogram disemprot dengan pereaksi Dragendrof.

Identifikasi saponin. Ekstrak diletakkan dalam tabung reaksi dan ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 5 menit. Adanya busa yang dapat bertahan selama 30 menit menunjukkan adanya senyawa saponin. Kemudian ekstrak ditambah 0,5 mL asetat anhidrat dan 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 1-2 mL asam sulfat, akan terbentuk 2 lapisan, cincin berwarna coklat kemerahan atau coklat ungu. Secara KLT dengan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam, n-butanol - asam asetat - air (4:1:5 v/v/v) sebagai fase gerak, adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau biru pada sinar tampak setelah kromatogram disemprot pereaksi Lieberman Burchard.

Identifikasi sterol dan triterpenoid. Pada ekstrak ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 0,5 mL kloroform dan dengan pipet sebanyak 1-2 mL asam sulfat, akan terbentuk 2 lapisan, bila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan kedua larutan menunjukkan adanya triterpenoid, warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol. Secara KLT dengan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam, n-heksana - etil asetat (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat, pada sinar tampak setelah kromatogram disemprot dengan serum sulfat kemudian dipanaskan 110°C menunjukkan adanya terpenoid.

Identifikasi kumarin. Ekstrak dibagi 2 tabung, pada tabung 1 ditambah 0.5 mL larutan ammonia 10%, tabung 2 untuk pembanding. Terjadinya warna biru atau hijau yang berfluoresensi pada lampu UV, menunjukkan keberadaan kumarin. Secara KLT dengan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam, etil asetat - toluena (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya kumarin ditunjukkan dengan terbentuknya pendar biru pada sinar UV 265 nm setelah kromatogram disemprot dengan kalium hidroksida.

Identifikasi adanya flavonoid. Ekstrak dilarutkan dalam metanol 50% (1-2 mL), dengan pemanasan kemudian ditambahkan logam Mg dan 5-6 tetes asam hidroklorida, larutan akan menjadi merah untuk flavonol dan oranye untuk flavanon. Secara KLT dengan selulose sebagai fase diam, etil asetat : toluena (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada sinar tampak, pemadaman pada sinar UV 254 nm, dan warna hitam, kuning, biru atau hijau pada sinar UV 365 nm setelah kromatogram diuji amonia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bahan tanaman yang dikenal dengan nama sirih merah tersebut merupakan spesies dengan nama ilmiah *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol terhadap 1,9 kg serbuk daun sirih merah yang berasal dari pengeringan 8,26 kg daun basah menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam sebanyak 224,03 g. Rendemen serbuk terhadap daun basah sebesar 23%, rendemen ekstrak terhadap daun basah sebesar 2,7%, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk sebesar 11,8%. Meskipun maserasi tidak menghasilkan ekstraksi yang komplit⁽¹⁹⁾, akan tetapi banyak penelitian memilih menggunakan metode ini karena maserasi merupakan prosedur sederhana untuk mendapatkan ekstrak, cocok untuk skala kecil maupun industrial, pengulangan proses perendaman merupakan upaya untuk mendapatkan sebanyak mungkin senyawa yang terekstraksi. Pemilihan jenis dan jumlah pelarut juga sangat menentukan jenis dan jumlah senyawa yang terekstraksi, hal ini sesuai dengan pernyataan Samuelsson⁽¹⁹⁾ yakni bahwa senyawa dalam tanaman biasanya berada di dalam sel, pelarut harus dapat berdifusi ke dalam sel untuk melarutkan molekul senyawa yang diinginkan kemudian dengan arah berlawanan melewati dinding sel dan bercampur dengan cairan di sekelilingnya. Kesetimbangan akan terjadi antara senyawa terlarut di dalam sel dengan pelarut di sekitar jaringan tanaman, dimana kecepatan kesetimbangan tersebut dipengaruhi oleh suhu, pH, ukuran partikel, dan gerakan dari pelarut. Penelitian ini dilakukan pada suhu kamar, karena diharapkan senyawa yang tidak tahan pemanasan tidak rusak oleh adanya pemanasan, efektivitas ekstraksi juga dioptimalkan dengan pengadukan.

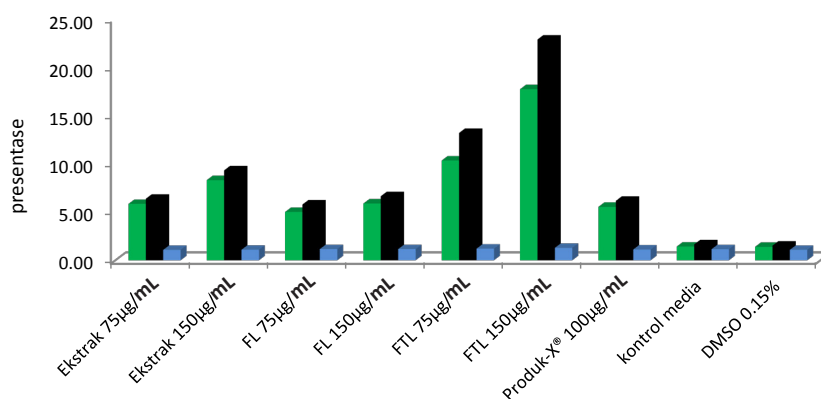
Anatomi daun sirih (*Piper betle*) dan daun sirih merah mirip, sedikit perbedaan yakni pada bagian atas vascular bundle *P. betle* dijumpai adanya sel-sel kolenkim sedangkan pada *P. crocatum* tidak dijumpai. Irisan melintang daun ke dua spesies sirih diatas teramati adanya saluran yang dihasilkan dari robekan-robekan sel, saluran tersebut berfungsi sebagai saluran minyak, selain itu juga terdapat sel-sel sekretori, sehingga kedua daun tersebut dapat digunakan sebagai bahan obat⁽²⁰⁾. Ekstrak metanol *Piper betle* dilaporkan memiliki daya imunomodulator⁽⁵⁾, daun sirih merah merupakan tanaman dalam genus yang sama yakni Piperaceae, oleh karena itu digunakan metanol sebagai pelarut dengan harapan senyawa yang terekstraksi memiliki aktivitas yang sejenis.

Makrofag merupakan sel fagositik utama yang berperan menangkal serangan patogen melalui mekanisme fagositosis, berperan penting baik pada respon imun bawaan maupun respon imun adaptif. Kemampuan fagositosis makrofag dapat diukur dari kemampuannya dalam memfagositosis partikel lateks. Aktivitas fagositosis dinyatakan dalam 3 parameter yakni Persen Fagositosis (PF), Indeks fagositosis (IF), dan Efisiensi Fagositosis (EF)⁽²¹⁾. Persen fagositosis adalah persen sel yang makan minimal 1 lateks yakni jumlah makrofag pada 2 bidang pandang yang makan minimal 1 lateks dibagi jumlah makrofag pada 2 bidang pandang dikalikan 100%. IF adalah jumlah lateks yang dimakan oleh makrofag pada 2 bidang pandang dikalikan 100 dibagi jumlah makrofag pada 2 bidang pandang, dan EF adalah rasio antara IF dan PF. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit dan analisis varian satu jalan menunjukkan perbedaan signifikan pada parameter PF dan IF, tetapi tidak signifikan untuk parameter EF baik pada uji ekstrak metanol daun sirih merah maupun pada uji fraksi-fraksi hasil KCV, sehingga uji Tukey dilakukan hanya untuk parameter EF dan IF. Fraksi tak larut metanol 60% dari ekstrak metanol daun sirih merah (FTL) menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag lebih besar dibandingkan ekstrak metanol daun sirih merah, fraksi larut metanol 60% dari ekstrak metanol daun sirih merah (FL), kontrol media, kontrol pelarut, maupun kontrol positif oleh karena itu fraksinasi lebih lanjut dilakukan terhadap FTL. Uji Tukey menunjukkan bahwa perlakuan FTL 150 µg/mL menyebabkan aktivitas fagositosis makrofag yang berbeda secara signifikan dibandingkan perlakuan dengan FTL 75 µg/mL, FL 75 µg/mL FL 150 µg/mL, kontrol media, kontrol pelarut (DMSO 0.15%), maupun kontrol positif (produk-X® 100 µg/mL). Oleh karena itu uji aktivitas

fagositosis fraksi-fraksi dari FTL diuji pada kadar 150 µg/mL. Produk-X® merupakan produk komersial yang mengandung 250 mg ekstrak *Echinacea*, kemampuan ekstrak *Echinacea* dalam meningkatkan fagositosis telah dilaporkan oleh Bauer⁽²⁾. Kenaikan dosis ekstrak, FL maupun FTL menjadi 2 kali lipat, tidak menunjukkan adanya kenaikan yang sebanding baik untuk parameter PF maupun IF.

Fraksinasi dari FTL dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) menghasilkan 11 fraksi. Berdasar kemiripan profil KLT, fraksi-fraksi tersebut digabung menjadi 5 fraksi. Jumlah fraksi yang terbanyak berturut-turut adalah fraksi III, fraksi IV, fraksi II, fraksi V, fraksi I. Dari tiga kali fraksinasi masing-masing sebanyak 2 gram FTL, berturut-turut menghasilkan 0,41 g, 0,49 g, dan 0,49 g fraksi II (F-II), atau rendemen F-II terhadap FTL sebesar 23.17%.

Hasil uji fagositosis makrofag secara *in vitro* terhadap F-I sampai F-V pada dosis 150 µg/mL menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag tertinggi pada perlakuan dengan F-II. Oleh karena itu F-II merupakan fraksi yang paling potensial dilanjutkan untuk isolasi senyawa imunomodulator. Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/mL menyebabkan aktivitas fagositosis makrofag untuk parameter PF yang berbeda secara signifikan dengan kontrol media dan kontrol pelarut akan tetapi tidak signifikan dengan perlakuan kontrol positif (produk-X® 150 µg/mL). Hal ini menunjukkan bahwa uji fagositosis makrofag secara *in vitro* menggunakan mencit BALB/c, perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/mL dan produk-X® 150 µg/mL menyebabkan PF yang sama. Untuk parameter IF, perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/mL menunjukkan nilai yang lebih tinggi secara signifikan dibanding perlakuan dengan produk-X® 150 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa F-II dosis



Gambar 1. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Keterangan: ■: persen fagositosis, ■: indeks fagositosis, ■: efisiensi fagositosis, Ekstrak: ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav, FL : ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. yang larut dalam metanol 60%, FTL: ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. yang tidak larut dalam metanol 60%.

Tabel 1. Penggabungan fraksi berdasar hasil uji KLT fraksi-fraksi hasil KCV ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Jenis	Pelarut		Fraksi awal	Jumlah (g)	Fraksi sesudah penggabungan
		Volume (mL)			
n-heksana		180	1	0,14	
n-heksana:etilasetat (9:1)		120	2	0,08	Fraksi I
n-heksana:etilasetat (8:2)		120	3	0,41	Fraksi II
n-heksana:etilasetat (7:3)		70	4	0,27	
n-heksana:etilasetat (6:4)		90	5	0,13	Fraksi III
n-heksana:etilasetat (5:5)		60	6	0,08	
n-heksana:etilasetat (4:6)		60	7	0,14	Fraksi IV
n-heksana:etilasetat (3:7)		90	8	0,17	
n-heksana:etilasetat (2:8)		120	9	0,10	
n-heksana:etilasetat (1:9)		120	10	0,08	Fraksi V
Etil asetat		120	11	0,11	

150 µg/mL mengaktifkan sejumlah makrofag yang sama banyak tetapi lebih banyak jumlah *latex* yang dimakan dibandingkan perlakuan dengan produk-X[®] dosis 150 µg/mL.

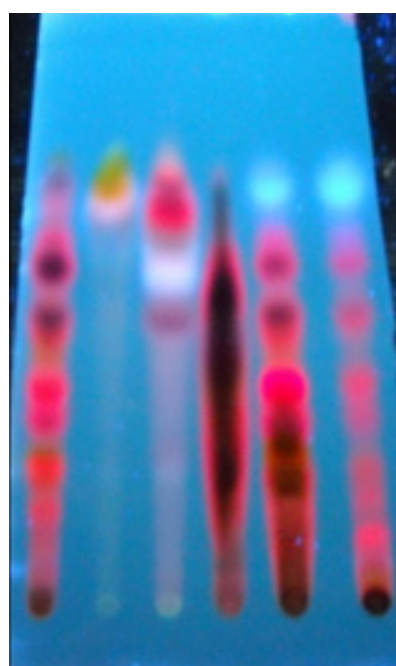
Skrining fitokimia berupa uji tabung serta uji kualitatif secara KLT dari ekstrak dan fraksi II menunjukkan bahwa ekstrak metanolik daun sirih merah mengandung minyak atsiri, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid, sedangkan fraksi II mengandung alkaloid dan terpenoid. Uji tabung merupakan cara uji sederhana terhadap keberadaan metabolit sekunder pada bahan uji. Uji awal ini dipertegas dengan uji kualitatif secara KLT. Hasil uji tabung keberadaan alkaloid dan flavonoid tidak terdeteksi akan tetapi terdeteksi dengan uji secara KLT. Hasil ini serupa baik pada ekstrak maupun fraksi, maka disimpulkan bahwa alkaloid dan flavonoid terdeteksi baik pada ekstrak maupun fraksi II. Fraksi II merupakan fraksi paling tinggi aktivitas imunomodulasinya, kemungkinan alkaloid dan atau terpenoid merupakan metabolit sekunder yang bertanggung jawab terhadap peningkatan aktivitas fagositosis makrofag.

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh dosis terhadap aktivitas fagositosis juga jenis serta mekanisme aksi senyawa yang bertanggung

Tabel 2. Hasil uji tabung dan uji KLT terhadap ekstrak dan fraksi II.

Jenis skrining	Ekstrak		Fraksi II	
	Uji tabung	Uji KLT	Uji tabung	Uji KLT
Minyak atsiri	+	Tidak dilakukan	-	Tidak dilakukan
Tanin	+	-	-	-
Alkaloid	-	+	-	+
Saponin	-	-	-	-
Terpenoid	-	+	-	+
Kumarin	-	-	-	-
Flavonoid	-	+	-	-

Keterangan: + = metabolit sekunder terdeteksi, - = metabolit sekunder tidak terdeteksi.

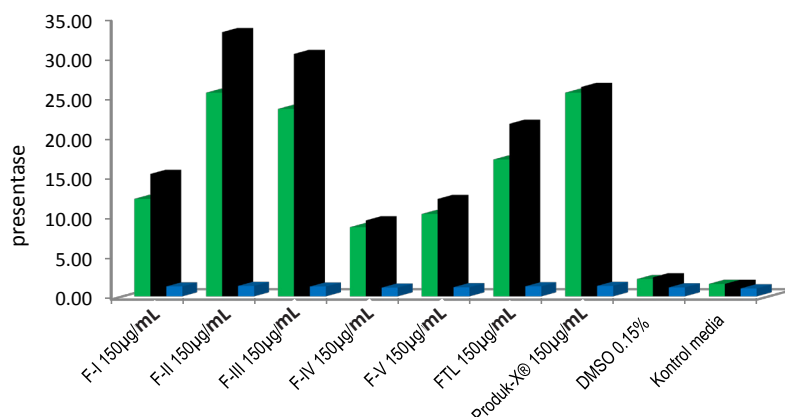


Gambar 2. Kromatogram dari kiri ke kanan FTL, Fraksi (F)-I, F-II, F-III, F-IV, dan F-V hasil kromatografi cair vakum, fase diam silika gel GF₂₅₄, fase gerak n-heksana : etil asetat (5:1), deteksi UV 366 nm.

jawab terhadap aktivitas tersebut. Penelitian tentang peningkatan aktivitas fagositosis makrofag karena pemberian ekstrak daun sirih merah ini merupakan penelitian awal dari *bioassay guided isolation* senyawa imunomodulator dari daun sirih merah. Hasil uji daya imunomodulator secara *in vitro* tidak ada korelasi dengan uji *in vivo*⁽¹⁾, maka perlu juga diteliti lebih lanjut secara *in vivo*.

SIMPULAN

Uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa fraksi hasil kromatografi cair vakum dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Fraksi II hasil kromatografi cair vakum dari fraksi tak larut metanol



Gambar 3. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari fraksi-fraksi hasil KCV pada dosis 150 µg/mL. Keterangan: ■: persen fagositosis, ■: indeks fagositosis, ■: efisiensi fagositosis.

60 % merupakan fraksi paling potensial untuk isolasi senyawa imunomodulator dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. mengandung minyak atsiri, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid, sedangkan fraksi II hasil pemisahan secara kromatografi kolom vakum mengandung alkaloid dan terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Wagner H, Kraus S, Jurcic K. Search for potent immunostimulating agents from plants and other natural sources, In: Wagner H, editor. Immunomodulatory agents from plants. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1999. 1-40.
- Wagner H, Kraus S, Jurcic K. . Chemistry, analysis and immunological investigations of Echinacea phytopharmaceuticals. In: Wagner H, editor. Immunomodulatory agents from plants. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1999. 41-89.
- Alamgir M and Uddin SK. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agents. *Ethnomedicine*. 2010. 3:227-44.
- Kumar S, Gupta P, Sharma S, Kumar D. A review on immunostimulatory plants. *Journal of Chinese Integrative Medicine*. 2011. 9:1-18.
- Kanjwani DG, Marathe TP, Chipunkar SV, Fan Sathaye SS. Evaluation of immunomodulatory activity of metanolic extract of *Piper betel*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008. 67: 589-93.
- Sunila ES and Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004. 90:339-46.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of genus Piper. *Phytochemistry*. 1997. 46:597-673.
- Manoi F. Sirih Merah sebagai tanaman obat multi fungsi. *Warta Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*. 2007. 13:2-6.
- Wicaksono BD, Handoko YA, Arung ET, Kusuma IW, Yulia D, Pancaputra AN, et al. Antiproliferative effect of metanol extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav leaves on human breast (T47D) cells *in vitro*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2009. 8:345-52.
- Suratmo. Aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) [tesis]. Yogyakarta: Prodi Ilmu Kimia Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada; 2008.
- Ponkshe CA and Indap MM. *In vivo* and *in vitro* evaluation for immunomodulatory activity of three marine animal extracts with reference to phagocytosis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2002. 40:1399-400.
- Coll JC and Bowden BF. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J Nat Prod*. 1986. 49:934-36.
- Leijh PCJ, Furth RV, Van Zwet TL. *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Weir DM, editor. *Cellular immunology*. 4th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1986.
- Wijanarko H. Aktivitas phalerin hasil isolasi dari daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) sebagai pemacu fagositosis makrofag dan antiradikal *in vitro* [tesis]. Yogyakarta: Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada; 2005.
- Wahyuniari IAI. Pengaruh pemberian minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamp) pada respon imun seluler setelah infeksi *Listeria monocytogenes* [tesis]. Yogyakarta: Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada; 2006.
- Derre I, Isberg RR. Macrophages from mice with the restrictive I gn1 allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun*. 2004. 72(11):6221-9.
- Ciulei J. *Methodology for analysis of vegetables and drugs*. Bucharest Rumania: Faculty of Pharmacy; 1981. 11-26.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. *Plant drug analysis, A thin layer chromatography atlas*. Berlin Heidelberg: Springer; 1984. 346-9, 42-4.

19. Samuelsson G. *Drugs of natural origin*. 4th Ed. Sweden: Swedish Pharmaceutical Press; 1999.
20. Sutikno, Nugroho LH, Yuliati IR, Priyono Y. *Anatomi dan profil minyak atsiri akar, batang dan daun sepuluh spesies genus piper koleksi Kebun Raya Bogor*. [laporan Penelitian]. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada; 2011.
21. Sanchez S, Paredes SD, Sanchez CL, Barriga C, Reiter RJ, Rodriquez AB. Tryptophan administration in rats enhances phagocytic function and reduces oxidative metabolism. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008. 29(6):1026-32.