

AKTIVITAS IMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN GAHARU *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke TERHADAP SEL MAKROFAG MENCIT (*Mus musculus* L.) SECARA IN VITRO [*The Immunomodulatory Activity of Leaves Extract of Gaharu Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke on Macrophage Cell of Mice (*Mus musculus* L.) in vitro]

Assyafiya Salwa^{1*}, Tri Rini Nuringtyas², Lisna Hidayati², Nastiti Wijayanti^{1✉*}

¹Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Sleman, Yogyakarta 55281, Indonesia

²Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Sleman, Yogyakarta 55281, Indonesia
email: nastiti_wijayanti@ugm.ac.id

ABSTRACT

The immune response is divided into innate immune response and adaptive immune response. Macrophages are one of the immunity cells that work both in innate and adaptive immune response. The activities of secondary metabolites present in agarwood-producing plants allow the potential for natural immunomodulators so that the purpose of this study was to determine the potential *G. versteegii* extract leaves as immunomodulator and to examine the effect of *G. versteegii* leaves extract toward macrophage cells of mice (*Mus musculus* L.). The steps to be carried out in this study were the preparation of *G. versteegii* leaves extract with multi-level extraction, collection of mouse macrophages, cytotoxicity test with MTT assay, phagocytosis activity test of macrophages calculated by light microscopy (400X), and Griess assay for NO production of macrophages. The cytotoxicity test resulted an IC₅₀ value of *G. versteegii* leaves extract was 183.45 µg/mL and positive control imboost® was 20.12 µg/mL. Based on the IC₅₀ results, concentrations of 200, 20, 10, and 1 µg/mL were used for *G. versteegii* leaves extract and for the positive control imboost® 10 and 1 µg/mL. This value used to determine the concentration of extract for phagocytosis activity test and NO production of macrophages test. The results showed that *G. versteegii* leaves extract has the potential as an immunomodulator and extract with 20 µg/mL concentration has the highest effect on phagocytosis activity and NO production.

Key words: immunomodulator, phagocytosis activity, cytotoxicity, *G. versteegii*, macrophage, and NO

ABSTRAK

Respons imun dibedakan menjadi respons imun bawaan dan respons imun adaptif. Makrofag merupakan salah satu komponen imun yang bekerja baik dalam respons imun bawaan maupun dalam respons imun adaptif. Aktivitas metabolit sekunder pada tanaman penghasil gaharu ini memungkinkan adanya potensi immunomodulator alami sehingga tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui potensi ekstrak bertingkat daun gaharu *G. versteegii* sebagai immunomodulator dan menguji pengaruh ekstrak bertingkat daun *G. versteegii* terhadap sel makrofag mencit (*Mus musculus* L.). Langkah-langkah yang dilakukan pada penelitian ini adalah preparasi ekstrak daun *G. versteegii* dengan ekstraksi-maserasi bertingkat, koleksi makrofag mencit *M. musculus*, uji sitotoksitas dengan MTT Assay, uji aktivitas fagositosis makrofag dihitung dengan mikroskop cahaya (400X), dan uji kadar NO makrofag dengan Griess Assay. Uji sitotoksitas menghasilkan nilai IC₅₀ untuk ekstrak daun gaharu *G. versteegii* sebesar 183,45 µg/mL dan kontrol positif Imboost® sebesar 20,12 µg/mL. Berdasarkan data IC₅₀ digunakan konsentrasi 200, 20, 10, dan 1 µg/mL untuk ekstrak daun gaharu *G. versteegii* dan untuk kontrol positif imboost® 10 dan 1 µg/mL digunakan untuk uji aktivitas fagositosis makrofag dan uji kadar NO. Pada uji aktivitas fagositosis dan uji kadar NO makrofag diperoleh hasil bahwa ekstrak daun gaharu *G. versteegii* berpotensi sebagai immunomodulator dan pada konsentrasi 20 µg/mL memiliki pengaruh tertinggi terhadap aktivitas fagositosis dan produksi NO.

Kata kunci: immunomodulator, aktivitas fagositosis, *G. versteegii*, makrofag, NO, dan sitotoksitas.

PENDAHULUAN

Sistem imun harus menjalankan empat tugas penting untuk melindungi individu dari serangan penyakit. Tugas tersebut adalah pengenalan imunologi (mendeteksi adanya benda asing yang masuk ke dalam tubuh organisme), fungsi efektor imun (mengeliminasi agen infeksius), regulasi imun (kemampuan *self-regulate* komponen-komponen imun), dan imunologikal memori (mengingat paparan/infeksi yang pernah terjadi). Respons imun dibedakan menjadi respons imun bawaan dan respons imun adaptif. Makrofag merupakan salah satu komponen imun yang bekerja baik dalam respons imun bawaan maupun dalam respons imun

adaptif. Sebagai sistem imun bawaan, makrofag (hasil diferensiasi dari monosit yang memasuki jaringan) berperan sebagai sel fagosit sedangkan dalam respons imun adaptif makrofag menjadi sel yang mempresentasikan antigen (substansi asing yang menstimulasi pembentukan antibodi) terhadap sel T limfosit dan mengaktifkan sel tersebut (Murphy, 2012)

Menurut Patil *et al.* (2012) immunomodulator alami berperan dalam memperkuat sistem imun yang lemah dan menyeimbangkan sistem imun yang terlalu reaktif. Komponen dalam tumbuhan, seperti sterol dan sterolin merupakan

*Kontributor Utama

*Diterima: 18 Juni 2021 - Diperbaiki: 15 Juni 2022- Disetujui: 15 Juni 2022

imunomodulator alami yang berperan sebagai penurun kolesterol. Imunomodulator dibedakan menjadi imunostimulan dan immunosupresan. Produk imunomodulator alami dari metabolit sekunder tumbuhan dapat menginduksi proses fagositosis oleh makrofag dan meningkatkan produksi NO dalam sel (Hanahan dan Winberg, 2011).

Indonesia termasuk salah satu negara dengan tanaman gaharu paling beragam. Salah satu jenis gaharu yang ada di Indonesia adalah *Gyrinops*. Genus ini termasuk ke dalam Famili Thymelaeaceae yang menjadi sumber potensial di Indonesia. Pohon gaharu memiliki banyak manfaat, seperti bahan baku obat-obatan, kosmetik dan parfum sehingga memiliki nilai komersial yang tinggi (Santoso dan Sumarma, 2006; Paoli *et al.*, 2001; Semiadi *et al.*, 2010). Wardana *et al.* (2019) menyatakan bahwa berdasarkan analisis fitokimia dengan ekstrak etanol dan kloroform, gaharu jenis *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke mengandung berbagai komponen bioaktif seperti squalene, asam palmitat, asam stearat, asam laurat, dan fitol yang memiliki fungsi sebagai antikanker, antibakteri, antioksidan, antitumor, antiinflamasi, antiproliferasi, antimikroba, dan antilarva. Selain itu, penelitian Nuringtyas *et al.* (2018) juga menyebutkan bahwa *G. versteegii* mengandung komponen metabolit sekunder, seperti fenolik, flavonoid, tanin, terpenoid, alkaloid, kuinon, dan kumarin yang memiliki aktivitas antioksidan.

Aktivitas-aktivitas metabolit sekunder yang ada pada tanaman penghasil gaharu ini memungkinkan adanya potensi imunomodulator alami yang hingga saat ini belum pernah dilaporkan. Maka dari itu, diperlukan penelitian potensi imunomodulasi alami *G. versteegii* melalui pengaruh ekstrak daun secara *in vitro* dengan sel makrofag mencit (*Mus musculus* L.).

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel daun gaharu *Gyrinops versteegii* (Gilg) Domke, diperoleh dari Perkebunan Gaharu di Pemalang, Jawa Tengah. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Biologi UGM. Perawatan hewan coba dan koleksi sel makrofag dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Uji sitotoksitas, uji aktivitas fagositosis makrofag dan uji kadar NO dilakukan di Falitma Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

Preparasi dan Ekstraksi

Sampel daun gaharu *G. versteegii* diambil dan dilap menggunakan tisu. Sampel daun ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu maksimal 55°C sampai beratnya konstan. Sampel daun yang telah kering ditimbang bobotnya,

kemudian dihaluskan dengan blender sampai berbentuk serbuk dan dilakukan berulang kali. Jenis ekstraksi yang dilakukan merupakan ekstraksi bertingkat dengan pelarut yang dipakai adalah larutan etanol, kloroform dan etil asetat. Metode ekstraksi didasarkan pada penelitian Elzaawely dan Tawata, (2012), dengan (salwa, 2021). Tahap I. Ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol diawali dengan menimbang 5 gram serbuk daun. Serbuk tersebut dicampur dengan etanol 80% (3x200 ml) lalu diaduk. Ekstrak diletakkan di lemari maserasi selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak dikoleksi, difiltrasi, direduksi volumenya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Derajat keasaman (pH) disesuaikan menjadi 11 dengan penambahan NaOH 4N secara perlahan. Tahap II. Ekstraksi dilanjutkan dengan pelarut kloroform. Ekstrak dari Tahap I dicampur dengan kloroform (5x150 ml) lalu diaduk. Ekstrak diletakkan di lemari maserasi selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak dikoleksi kemudian direduksi volumenya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Derajat keasaman (pH) disesuaikan menjadi 2 dengan penambahan HCl 6N secara perlahan. Tahap III. Ekstraksi dilanjutkan dengan pelarut etil asetat. Ekstrak dari Tahap II dicampur dengan etil asetat (5x150 ml) dalam erlenmeyer lalu diaduk. Ekstrak diletakkan di lemari maserasi selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak dikoleksi, difiltrasi dengan kertas saring kemudian direduksi volumenya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak diuapkan di lemari maserasi hingga berbentuk pasta kemudian dipindahkan ke dalam botol flakon untuk disimpan di kulkas.

Koleksi Sel Makrofag

Koleksi makrofag diambil dari mencit umur 8 minggu dengan berat sekitar 25 – 35 g melalui rongga peritonium. Metode yang dilakukan berdasarkan penelitian Hartini *et al.* (2013) dengan modifikasi. Mencit dianestesi dengan overdosis ketamin:xylazine (1:1) dengan dosis 50 mg/kgBB. Tubuh mencit dibersihkan dengan etanol 70% kemudian kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritonium. Medium RPMI 1640 disuntikkan sebanyak 10 ml ke dalam rongga peritonium kemudian ditunggu sekitar 3 menit sambil digoyang-goyangkan secara perlahan. Cairan peritonial diambil dari rongga peritonium dengan injeksi spuit pada daerah yang jauh dari lemak dan usus. Cairan dimasukkan dalam tabung konikel lalu disentrifugasi pada 1200 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet di dasar tabung ditambah dengan medium RPMI komplet sebanyak 1 ml kemudian di-vortex perlahan. Makrofag yang telah dikoleksi, dihitung dengan hemositometer. Selanjutnya, dihitung jumlah sel per sumuran yang diperlukan untuk ditanam pada *microplate*,

kemudian dihitung jumlah volume panen sel yang diperlukan (mL) untuk ditanam pada *microplate*. Selanjutnya, diambil suspensi sel pada stok sel sejumlah volume panen yang telah dihitung dan dipindahkan dalam tabung konikal. Suspensi tersebut diencerkan dengan medium RPMI komplit hingga total volume yang diperlukan untuk mengisi mikroplate.

Uji Sitotoksisitas

Uji sitotoksisitas dari ekstrak dilakukan dengan metode *MTT Assay* dengan seri konsentrasi. Suspensi sel yang telah dihitung dan diencerkan, dikultur pada *microplate 96-well*. Setiap sumuran diisi 100 µl suspensi sel (berisi sekitar 5×10^4 sel) dengan menyisakan 3 sumuran tanpa sel. *Microplate* berisi suspensi diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Medium dibuang dan diganti dengan sampel uji yang telah diencerkan pada medium RPMI (mengandung 1% *penicillin-streptomycin*). Sampel yang digunakan adalah ekstrak daun gaharu *G. versteegii* dan kontrol positif (produk-X[®]) yang dibuat 8 seri konsentrasi (2000, 729, 234, 81, 27, 9, 3, dan 1 µg/mL), kontrol sel (media kultur RPMI + sel), dan kontrol pelarut (DMSO 0,1%). Sampel diambil sebanyak 100 µL tiap konsentrasi lalu dimasukkan dalam *microplate 96-well* yang berisi suspensi sel makrofag sebanyak 100 µl/sumuran kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Setiap kolom sumuran dari sampel disisakan 1 sumuran kosong sebagai kontrol media. Setelah diinkubasi, media dibuang dan ditambahkan 1 mL MTT 5 mg/ml dalam PBS yang telah diencerkan dengan medium RPMI (mengandung 1% *penicillin-streptomycin*) dan diinkubasi kembali inkubator CO₂ selama 4 jam. Selesai inkubasi, reaksi dihentikan dengan penambahan SDS 10% dalam HCl 0,01 N sebanyak 100 µl/sumuran. *Microplate* kemudian dibungkus setelah ditambahkan SDS dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Hasil dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm untuk memperoleh data absorbansi sampel (CCRC, 2013). Persentase sel hidup dihitung dari data absorbansi kemudian dibuat kurva hubungan log konsentrasi versus % sel hidup dan dihitung harga IC₅₀ (CCRC, 2013).

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag

Uji aktivitas fagositosis makrofag dilakukan dengan *latex beads* dan parameter uji adalah aktivitas fagositosis dan kapasitas fagositosis, mengacu pada Jensch-Junior et al. (2006) dan Hartini et al. (2013) dengan beberapa (salwa, 2021). Suspensi sel yang telah dihitung dan diencerkan, dikultur pada *microplate 24-well* yang telah diberi *coverslips* bulat. Setiap sumuran diisi

200 µl suspensi sel (berisi sekitar 5×10^5 sel). *Microplate* berisi suspensi diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 30 menit. Medium RPMI komplit ditambahkan hingga 1 mL/sumuran kemudian diinkubasi lagi selama 2 jam. Sel dicuci dengan medium RPMI komplit sebanyak 2 kali lalu ditambahkan dengan medium RPMI komplit sebanyak 1 ml/sumuran. Suspensi sel diinkubasi kembali selama semalam atau 12–18 jam. Setelah inkubasi semalam, medium dibuang dan diganti dengan medium RPMI (mengandung 1% *penicillin-streptomycin*). Masing-masing sumuran ditambahkan 1 mL ekstrak *G. versteegii* dan kontrol positif (Imboost[®]) dengan kadar 200, 100, 20, 10, dan 1 µg/mL, dan kontrol negatif (RPMI mengandung 1% *penicillin-streptomycin*) secara triplo (3 *coverslips*) kemudian diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. *Latex beads* berdiameter 0,8 µm diresuspensi dalam PBS sehingga diperoleh konsentrasi 5×10^6 partikel/200 µL PBS. Suspensi *latex beads* ditambahkan pada sumuran dan diinkubasi selama 1 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Media diambil dengan cara dipipet dan dikoleksi untuk pemeriksaan kadar NO. Sel pada sumuran dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali untuk menghilangkan *latex beads* yang tidak terfagositosis kemudian dikeringkan pada suhu ruang dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Metanol dibuang dan ditunggu hingga kering kemudian dicat dengan larutan Giemsa 5% selama 30 menit. Setelah 30 menit, media dicuci dengan akuades sampai akuades menjadi jernih kemudian dikeringkan pada suhu ruang. *Coverslip* dipindahkan pada gelas benda dan diamati dengan mikroskop cahaya (400x) (Hartini et al., 2013).

Aktivitas fagositosis dinyatakan dalam 2 parameter, yaitu aktivitas fagositosis dan kapasitas fagositosis. Aktivitas fagositosis yaitu jumlah sel makrofag yang memfagositosis *latex beads* dalam 100 sel makrofag dan kapasitas fagositosis, yaitu jumlah lateks yang difagositosis oleh 100 sel makrofag. Masing-masing konsentrasi perlakuan dihitung sebanyak 3 ulangan dengan mikroskop. Hasil yang diperoleh, dibandingkan dengan kontrol (Jensch-Junior et al., 2006).

Uji Kadar NO

Uji kadar NO dilakukan berdasarkan metode *Griess Assay* dan absorbansi dibaca menggunakan ELISA reader. Langkah pertama yang dilakukan adalah deproteinasi sampel. Sampel sebanyak 170 µL dicampur dengan 30 µL reagen A (Zn₂SO₄ 15 g/L dalam akuades) dalam mikrotube berukuran 1,5 mL kemudian divortex selama 1 menit. Sampel disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 x g kemudian dipindah ke *microplate-96 well* sebanyak 100 µL/sumuran.

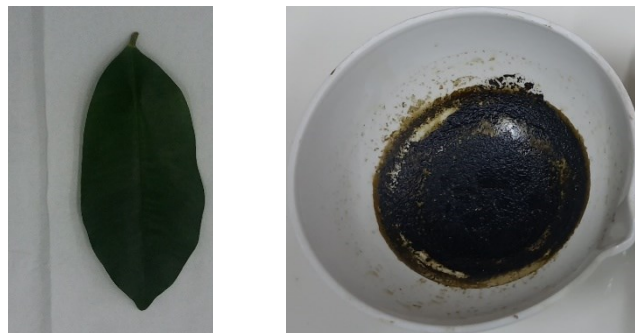
Selanjutnya, preparasi sampel untuk *Griess Assay*. Sampel yang telah dideproteinasi kemudian ditambah dengan 50 µl larutan Griess II (2% sulfanilamid dalam 5% H₃PO₄) kemudian ditambah dengan 50 µl Griess I (0,1% NED dalam akuades). Supernatan diinkubasi selama 30 menit dan dikerjakan dalam keadaan minim cahaya. Sampel kemudian dipindahkan ke *microplate 96-well* dengan pengulangan 3 kali setiap sampel dan disisakan 3 sumuran *Microplate 96-well* dimasukkan dalam *ELISA reader* dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 490 nm dalam kondisi gelap. Ketiga, persiapan larutan standar. Larutan standar sebanyak 200 µl dengan konsentrasi 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; dan 3,13 µM ditambahkan dalam *microplate 96-well* sebanyak 3 kali ulangan dan dilabeli. *Microplate 96-well* dimasukkan dalam *ELISA reader* dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 490 nm dalam kondisi gelap. Nilai absorbansi

sampel dikonversi menjadi total konsentrasi dengan menggunakan kurva standar yang dibentuk dari nilai absorbansi larutan standar dan konsentrasi larutan standar.

HASIL

Preparasi dan Ekstraksi Daun Gaharu *G. Versteegii*

Daun gaharu *G. versteegii* yang dipilih untuk dijadikan simplisia berupa bubuk adalah daun yang dewasa dengan ciri berwarna hijau gelap tanpa bercak hitam maupun putih. Hasil dari tahap ekstraksi yang dilakukan diperoleh berat ekstrak sebesar 0,8 gram dari 5 gram simplisia daun gaharu *G. versteegii* atau diperoleh ekstrak sebesar 16%. Ekstrak berbentuk pasta, basah, dan berwarna hijau tua (Gambar 1).

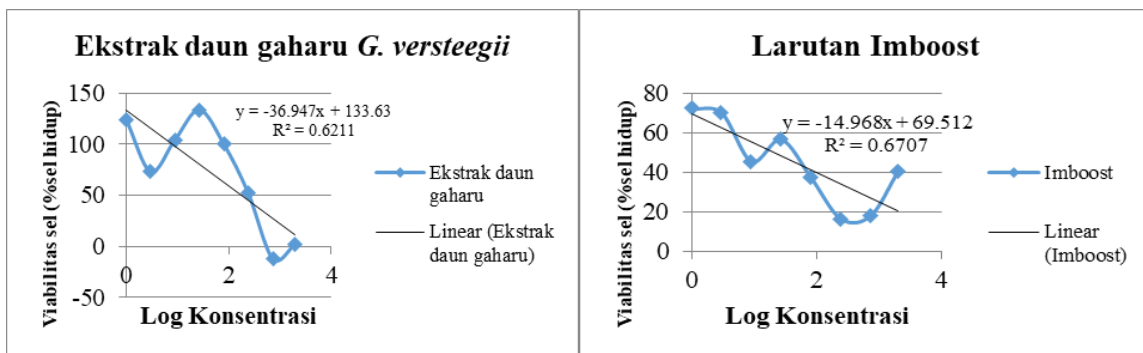


Gambar 1. Morfologi dan Ekstrak Pasta Daun Gaharu *G. versteegii*. (*Morphology and Extract of Gaharu Leaf Paste *G. versteegii**).

Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas ekstrak dilakukan dengan metode *MTT assay* dengan tujuan untuk

mengetahui tingkat toksisitas senyawa uji. Nilai IC₅₀ yang diperoleh dijadikan data acuan dalam tahap penelitian selanjutnya.

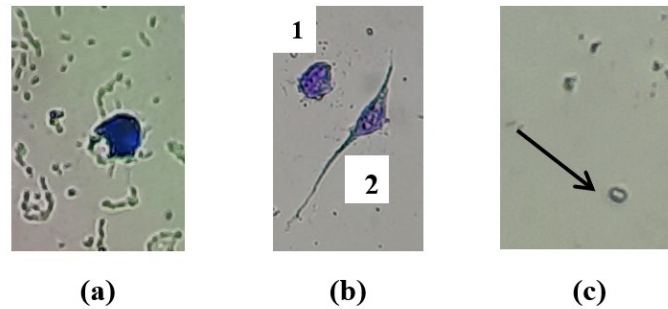


Gambar 2. Grafik Pengaruh Ekstrak Daun Gaharu *G. versteegii* dan Larutan Imboost® terhadap Nilai Viabilitas Sel Makrofag. (*Graph of Effect of *G. versteegii* Leaf Extract and Imboost® Solution on Macrophage Cell Viability Values*).

Nilai IC₅₀ dari MTT assay ekstrak daun gaharu *G. versteegii* sebesar 183,45 µg/mL dengan persamaan regresi $y = -36,947x + 133,63$ dan nilai R² = 0,6211 dan larutan Imboost® sebesar 20,12 µg/mL dengan persamaan regresi $y = -14,968x + 69,512$ R² = 0,6707 (Gambar 2).

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag

Uji aktivitas fagositosis sel makrofag dilakukan setelah diketahui konsentrasi ekstrak yang tepat dari uji sitotoksitas.



Gambar 3. Morfologi (a) makrofag dorman; (b) 1. makrofag aktif tanpa pseudopodia, 2. makrofag aktif dengan pseudopodia; dan (d) latex beads. (Morphology (a) dormant macrophages; (b) 1. active macrophages without pseudopodia, 2. active macrophages with pseudopodia; and (d) latex beads).

Tabel 1. Aktivitas fagositosis makrofag terhadap ekstrak daun gaharu *G. versteegii*. (Phagocytic activity of macrophages against gaharu leaf extract *G. versteegii*).

Perlakuan (Treatment)	Jenis Ekstrak (Type Extract)	Konsentrasi (µg/mL) (Concentration)	Rata-Rata(%) (Average)
<i>G. versteegii</i>	Bertingkat (etanol 80%, kloroform, etil asetat)	200	72,67±4,24
		20	80,17±1,25
		10	76,33±2,87
		1	73,67±5,72
Kontrol positif (Imboost®)		10	76,67±2,36
		1	74,67±5,44
Kontrol negatif			74,33±3,29

Berdasarkan Tabel 1, ekstrak daun gaharu *G. versteegii* memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas atau persentase fagositosis dari sel makrofag. Ekstrak konsentrasi 200 dan 1 µg/mL memiliki persentase fagositosis terendah dan lebih rendah daripada kontrol media sedangkan pada konsentrasi 20 dan 10 µg/mL persentase fagositosis lebih tinggi daripada kontrol media. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi 200 dan 1 µg/mL ekstrak daun gaharu *G. versteegii* menurunkan persentase sel makrofag yang aktif melakukan aktivitas fagositosis terhadap latex beads sedangkan pada konsentrasi 20 dan 10 µg/

mL meningkatkan persentase sel makrofag yang aktif melakukan aktivitas fagositosis terhadap latex beads. Persentase aktivitas fagositosis ekstrak daun gaharu terbesar adalah pada ekstrak dengan konsentrasi 20 µg/mL, yaitu sebesar 80,17±1,25%. Konsentrasi tersebut memiliki persentase aktivitas fagositosis yang lebih besar dari perlakuan kontrol media, yaitu 74,33±3,29% dan kontrol positif (Imboost®), yaitu 76,67±2,36% pada konsentrasi 10 µg/mL dan 74,67±5,44% pada konsentrasi 1 µg/mL.

Tabel 2. Kapasitas fagositosis makrofag terhadap ekstrak daun gaharu *G. versteegii*. (*Phagocytic capacity of macrophages against gaharu leaf extract G. versteegii*).

Perlakuan (Treatment)	Jenis Ekstrak (Type Extract)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) (Concentration)	Rata-Rata(%) (Average)
<i>G. versteegii</i>	Bertingkat (etanol 80%, kloroform, etil asetat)	200	394,04 \pm 15,77
		20	484,94 \pm 4,64
		10	448,00 \pm 17,51
		1	433,68 \pm 57,28
Kontrol positif		10	481,04 \pm 44,00
		1	474,04 \pm 30,50
Kontrol negatif			360,46 \pm 11,20

Berdasarkan Tabel 2, ekstrak daun gaharu *G. versteegii* memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kapasitas fagositosis dari sel makrofag. Ekstrak konsentrasi 200, 20, 10 dan 1 $\mu\text{g/mL}$ memiliki kapasitas fagositosis lebih tinggi daripada kontrol media. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun gaharu *G. versteegii* meningkatkan persentase sel makrofag yang aktif melakukan aktivitas fagositosis terhadap *latex beads*. Kapasitas fagositosis makrofag tertinggi terdapat pada ekstrak daun gaharu dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ yaitu 484,94 \pm 4,64 partikel. Konsentrasi tersebut memiliki kapasitas fagositosis yang lebih besar dari perlakuan kontrol media, yaitu 360,46 \pm 11,20 dan

kontrol positif (Imboost[®]) yaitu 474,04 \pm 30,50 pada konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ dan 481,04 \pm 44,00 pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$.

Uji Kadar NO

Uji terakhir yang dilakukan setelah uji aktivitas fagositosis makrofag adalah pengukuran kadar NO yang dihasilkan oleh sel makrofag selama proses fagositosis. Sampel diuji dengan metode *Griess Assay*. Uji kadar nitrit oksida (NO) dapat dilakukan sebagai pengukuran aktivitas makrofag.

Tabel 3. Kadar NO makrofag. (*Macrophage NO levels*).

Perlakuan (Treatment)	Jenis Ekstrak (Type Extract)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) (Concentration)	Rata-Rata(%) (Average)
<i>G. versteegii</i>	Bertingkat (etanol 80%, kloroform, etil asetat)	200	2,65 \pm 0,14
		20	3,05 \pm 0,04
		10	2,74 \pm 0,02
		1	2,69 \pm 0,89
Kontrol positif		10	3,18 \pm 1,07
		1	2,09 \pm 0,25
Kontrol negatif			2,70 \pm 0,72

Berdasarkan Tabel 3, kadar NO paling tinggi pada ekstrak daun gaharu terdapat pada perlakuan konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai 3,05 \pm 0,04. Kadar NO paling tinggi pada Imboost terdapat pada perlakuan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai 3,18 \pm 1,07. Bila dibandingkan dengan kontrol media dengan nilai 2,70 \pm 0,72, terjadi peningkatan produksi NO pada perlakuan ekstrak daun gaharu konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ dan perlakuan Imboost konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Bila dibandingkan antara ekstrak daun gaharu dengan larutan Imboost pada konsentrasi yang sama, produksi NO lebih besar terjadi pada ekstrak daun gaharu.

PEMBAHASAN

Preparasi dan Ekstraksi Daun Gaharu *G. Versteegii*

Efektivitas ekstraksi fitokimia dari suatu bagian tumbuhan ditentukan oleh jenis pelarut yang digunakan karena senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman memiliki sifat kelarutan atau polaritas yang berbeda-beda sehingga pelarut dengan polaritas yang setara akan mengoptimalkan jumlah dan jenis senyawa yang diisolasi. Hal tersebut berkaitan dengan prinsip *like dissolve like* sehingga senyawa bioaktif dengan polaritas yang sama dengan pelarutnya akan larut (Ajanal *et al.*, 2012; Mahdi-Pour *et al.*, 2012). Polaritas, pelarut dari paling polar ke non polar adalah: Etanol>Etil Asetat>Kloroform (Altemimi *et al.*, 2017).

Uji Sitotoksitas

U.S *National Cancer Institute* menyebutkan kategori dalam senyawa sitotoksik terdiri atas 4 kategori, yaitu kategori sitotoksitas kuat jika nilai

$IC_{50} \leq 20$ $\mu\text{g/ml}$, kategori sitotoksik moderat jika nilai IC_{50} 21–200 $\mu\text{g/ml}$, kategori sitotoksik lemah

jika nilai IC_{50} 201–500 $\mu\text{g/ml}$ dan nilai $IC_{50} \geq 500$ $\mu\text{g/ml}$ (Abdel-Haneed *et al.*, 2012). Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh, ekstrak daun gaharu *G. versteegii* termasuk dalam kategori sitotoksitas moderat. Sel yang hidup akan mereduksi MTT menjadi formazan sedangkan sel yang mati tidak mampu melakukan proses tersebut (Bahuguna *et al.*, 2017). Hal tersebut menunjukkan tingkat sitotoksitas senyawa yang diuji. Semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi potensi senyawa dalam membunuh sel dan sebaliknya.

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun gaharu *G. versteegii* dan larutan Imboost relatif menyebabkan penurunan viabilitas sel makrofag. Seiring dengan peningkatan konsentrasi senyawa yang diuji maka kondisi sel juga semakin rusak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak yang tinggi menyebabkan sel lisis (Meyer, 2008). Setelah diketahui nilai sitotoksitas ekstrak daun gaharu *G. versteegii*, maka dosis tertinggi yang dipakai untuk pengujian ekstrak daun gaharu sebagai imunomodulator selanjutnya adalah 200, 20, 10, dan 1 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan untuk larutan Imboost digunakan konsentrasi sebesar 10 dan 1 $\mu\text{g/mL}$.

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag

Sel makrofag dengan pewarnaan Giemsa tampak merah keunguan dengan inti sel yang berwarna lebih pekat daripada vakuola karena penyerapan warnanya lebih kuat. Sel makrofag berbentuk bulat menandakan sel tersebut dalam keadaan dorman sedangkan sel yang berbentuk tidak beraturan berarti sel tersebut aktif melakukan aktivitas fagositosis (Rehana *et al.*, 2011). Aktivitas fagositosis makrofag juga ditunjukkan dengan penuluran pseudopodia pada sel (Mustafiah *et al.*, 2011).

Wagner and Jurcic. (1991), menyebutkan bahwa suatu bahan uji teridentifikasi adanya efek stimulan atau peningkatan aktivitas fagositosis sel apabila nilai aktivitas/persen fagositosis dan kapasitas fagositosis dari perlakuan bahan uji lebih besar dari perlakuan kontrol. Hasil penelitian menunjukkan terdapat, peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis akibat pengaruh bahan uji. Perbandingan ekstrak daun gaharu berupa Imboost mengandung ekstrak *Echinacea* yang secara klinis telah terbukti sebagai imunomodulator alami. Apabila dibandingkan dengan perbandingan Imboost, ekstrak daun gaharu *G. versteegii* pada

konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ telah memenuhi standar sebagai imunomodulator alami.

Senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak daun gaharu *G. versteegii* yang diduga berperan dalam meningkatkan aktivitas makrofag antara lain adalah terpenoid, asam lemak (Wardana *et al.*, 2019) fenol, (Septiani *et al.*, 2018) tanin, triterpenoid, alkaloid, fenol hidroquinon, steroid (Wahyuningrum *et al.*, 2018) dan flavonoid (Septiani *et al.*, 2018; Wahyuningrum *et al.*, 2018). Berdasarkan Shahbazi and Bolhassani. (2017), komponen polifenol pada ekstrak *Zingiber officinale* menyebabkan peningkatan proliferasi sel fagosit (neutrofil dan makrofag) sehingga meningkatkan aktivitas fagositosis dari sel-sel tersebut. Kandungan polifenol pada minuman teh meningkatkan proliferasi dan aktivasi dari sel T (CD^{4+} dan CD^{8+}) dan sekresi $IFN\gamma$ akibat stres oksidatif (Grigore, 2017).

Ekstrak daun gaharu *G. versteegii* diduga menginduksi ekspresi sitokin, seperti $IFN\gamma$, sitokin utama dalam aktivasi makrofag. Sitokin ini dihasilkan oleh sel T *helper*. Sel Th yang berdiferensiasi menjadi sel Th_1 bertugas dalam mensekresi beberapa jenis sitokin yang mengaktifasi makrofag untuk melakukan aktivitas fagositosis. Flavonoid mengaktifasi IL-12 yang disekresikan oleh makrofag dan bertugas merangsang aktivasi sel Th_1 . Sel Th_1 kemudian mensekresi sitokin berupa $IFN\gamma$ untuk aktivasi makrofag (Grigore, 2016; Abror *et al.*, 2018).

Penelitian Wahyuni *et al.* (2019) dengan ekstrak etanol spons (*Melophlus sarasinorum*) dan Yusuf *et al.* (2019) dengan penelitian ekstrak etanol daun tumbuhan galing (*Cayratia trifolia* L. Domin) terhadap makrofag menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas fagositosis karena kandungan senyawa dari golongan flavonoid pada ekstrak tersebut. Flavonoid merupakan substansi fenolik berwarna yang termasuk dalam senyawa polifenol. Keberadaan flavonoid pada organ tumbuhan dalam bentuk glikosida atau aglikon (Grigore, 2017; Hosseinzade *et al.*, 2019).

Uji Kadar NO

Makrofag yang teraktivasi akan meningkatkan produksi NO. Makrofag yang teraktivasi oleh perlakuan sampel uji akan memperkuat proses fagosit dengan menghasilkan senyawa nitrit oksida (NO) yang sangat efektif dalam melawan infeksi bakteri (Abror *et al.*, 2018). Peningkatan produksi NO makrofag dengan perlakuan ekstrak daun gaharu *G. versteegii* ini linear dengan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada uji sebelumnya. Ekstrak daun gaharu *G. versteegii* pada konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ mengalami peningkatan produksi NO tertinggi dibandingkan perlakuan ekstrak pada konsentrasi lainnya karena makrofag dengan

perlakuan ekstrak pada konsentrasi tersebut memiliki aktivitas fagositosis tertinggi. Selama proses fagositosis, makrofag menghasilkan berbagai produk toksin yang membantu untuk mencerna patogen yang menyerang tubuh. Salah satu senyawa toksin tersebut adalah oksida nitrit (NO). NO dalam jumlah tinggi dihasilkan oleh makrofag diinisiasi oleh sitokin pro-inflamasi dan produk yang dikeluarkan oleh bakteri. Senyawa ini diproduksi oleh oksida nitrit sintase (NOS), seperti iNOS dan eNOS. Enzim NOS mengubah L-arginin dalam bentuk NO dan L-sitruilin melalui N-hydroxyl-L-arginin intermediet (Tripathi *et al.*, 2007)

KESIMPULAN

Ekstrak daun gaharu *G. versteegii* berpotensi sebagai imunomodulator melalui peningkatan aktivitas fagositosis dan produksi kadar nitrit oksida (NO). Kandungan polifenol terutama flavonoid pada ekstrak tersebut berperan memicu terjadinya proses fagositosis oleh sel makrofag. Konsentrasi ekstrak yang diduga paling berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas fagositosis dan produksi NO dari sel makrofag adalah ekstrak pada konsentrasi 20 µg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) Gaharu Tahun 2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Hameed, E.S.S., Bazaid, S.A., El-Sayed, M.M. and El-Walkil, E.A., 2012. Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer, and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*, 2(2), pp.93–112.
- Abror, Y.K., Woelansari, E.D. dan Suhariyadi, 2018. Imunomodulator ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap jumlah sel makrofag peritoneal pada mencit yang diinduksi vaksin BCG, *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 8(1), pp.8–14.
- Ajanal, M., Gundkalle, M. and Nayak S., 2012. Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. *Ancient Science of Life*, 31(4), pp.198–201.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei A., Watson, D.G. and Lightfoot, D.A., 2017. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(42), pp.1–23.
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V.K. and Kang, S.C., 2017. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 12, pp.115–118.
- CCRC. 2013. *Protokol Uji Sitotoksik Metode MMT*. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta, pp.1–8.
- Ellis, R., 2007. *Giemsa's Staining Protocol for Tissue Section*. IMVS Division of Pathology Queen Elizabeth Hospital. Birmingham.
- Elzaawely, A.A. and Tawata, S., 2012. Antioxidant activity of phenolic rich fraction obtained from *Convolvulus arvensis* L. leaves grown in Egypt. *Asian Journal of Crop Science*, 4, pp.32–40.
- Grigore, A., 2017. Plant phenolic compounds as immunomodulatory agents. in: Soto-Hernandez, M., M. Palma-Tenago, and M.R. Garcia-Mateo., editor. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. IntechOpen. London.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hartini, Y.S., Wahyuono, S., Widyarini, S. dan Yuswanto A., 2013. Uji aktivitas fagositosis makrofag fraksi-fraksi dari ekstrak Metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 11(2), pp.108–115.
- Hosseinzade, A. Sadeghi, O., Biregani, A.N., Soukhtehzari, S., Brandt, G.S. and Esmailzadeh, A., 2019. Immunomodulatory effects of flavonoids: possible induction of T CD⁴⁺ regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Frontiers in Immunology* 10(51):1–10.
- Jensch-Junior, B.E., Pressinotil, N., Borges, J.C.S. and Silva, C.D., 2006. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus srofa*. *Aquaculture*, 251, pp.509–515.
- Lestarini, I.A., 2008. Pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L. terhadap respon imunitas seluler mencit BALB/c yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*. Thesis. Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia.
- Meyer, G., 2008. *Innate (non-specific) Immunity*. *Microbiology and Biology Online*. The Board of Trustees of the University of South Carolina.
- Mahdi-Pour, B., Jothy, S.L., Latha, L.Y., Chen, Y. and Sasidharan, S., 2012. Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(12), pp.960–965.
- Mubayinah dan Rahayuningsih, H.M., 2015. Pengaruh ekstrak lompong (*Colocasia esculenta* L. Schoot) 45 menit pengukusan terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO

- (Nitrit Oksida) mencit BALB/c sebelum dan sesudah terinfeksi *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nutrition College*, 4(2), pp.578–584.
- Murphy, K., 2012. *Janeway's immunobiology, 8th edition*. Garland Science, Taylor and Francis Group. New York.
- Mustafiah, I., Fatmawati, S. dan Yusuf., 2011. Indeks daya fagosit makrofag peritoneum setelah pemberian propolis pada mencit (*Mus musculus*). *Journal Sains Medika* 3(2), pp.121 – 128.
- Nuringtyas T.R., Isomarina, R., Septia, Y., Hidayati, L., Wijayanti, N. and Moeljopawiro, S., 2018. The antioxidant and cytotoxic activities of the chloroform extract of agarwood (*Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke) leaves on HeLa cell lines. *AIP Conference Proceedings*, 2002(1):020067.
- Paoli, G.D., Peart, D.R., Leighton, M. and Samsudin, I., 2001. An ecological and economic assessment of the nontimber forest product gaharu wood in Gunung Palung National Park, West Kalimantan, Indonesia. *Conservation Biology*, 15(6), pp.1721–1752.
- Patil, U.S., Jaydeokar, A.V. and Bandawane, D.D., 2012. Immunomodulators: a pharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), pp.30–36.
- Rehana., E.P.N., Rachmani, I. dan Sobri., 2011. Aktivasi fagositosis makrofag menggunakan ekstrak N-Heksan daun lidah buaya (*Aloe vera*). *Acta Pharmaciae*, 1(1)32–35.
- Salwa, A., 2021. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Daun Gaharu *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke terhadap Sel Makrofag Mencit (*Mus musculus* L.) secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Indonesia.
- Santoso, E. dan Sumarna, Y., 2006. *Budidaya dan Rekayasa Produksi Gaharu pada Jenis Pohon Penghasil Gaharu*. Pulitbang Hutan Konservasi Alam. Bogor.
- Semiadi, G., Wiriadinata, H., Waluyo, E.B. dan Darnaedi, D., 2010. Rantai pasokan produk tumbuhan gaharu (*Aquilaria* spp.) asal Merauke, Papua. *Buletin Plasma Nutfah*, 16(2): 150–159.
- Septiani, N.K.A., Parwata, I.M.O.A. dan Putra, A.A.B., 2018. Penentuan kadar total fenol, kadar total flavonoid, dan skrining fitokimia ekstrak etanol daun gaharu (*Gyrinops versteegii*). *Wahana Matematika dan Sains: Jurnal Matematika, Sains, dan Pembelajarannya*, 12(1), pp.78–89.
- Shahbazi, S. and Bolhassani, A., 2017. Immunostimulants: types and functions. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases* 4(3): 45–51.
- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L. and Singh, V., 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology Medical Microbiology*. 51, pp.443–452.
- Wagner, H. and Jurcic, K., 1991. *Assay for immunomodulation and effect on mediators of inflammation*. In Dey PM and Harborne JB editor. *Methods in plants biochemistry; assay for bioactivity*, Vol. VI, Academic Press.
- Wahyuni, M.I., Yusuf, Malik, F., Lubis, A.F., Indalifiany, A. dan Sahidin, I., 2019. Efek imunomodulator ekstrak etanol spons *Melophlus sarsinorum* terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag pada mencit jantan BALB/c. *Jurnal Farmasi Galenika*, 5(2), pp.147–157.
- Wahyuningrum, M., Sari, R.K. dan Rafi, M., 2018. Aktivitas antioksidan dan tabir surya ekstrak daun *Gyrinops versteegii*. *Journal Ilmu dan Teknologi Kayu Tropis* 16(2), pp.141–149.
- Wardana, T.A.P., Nuringtyas, T.R., Wijayanti, N. and Hidayati, L., 2019. Phytochemical analysis of agarwood (*Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke leaves extracts as anticancer using GC-MS. *AIP Conference Proceedings*, 2194, pp.020136-1–020136-9.
- Yusuf, M., Firdayanti, I. and Wahyuni, 2019. Peningkatan imunitas non spesifik (*Innate Immunity*) mencit BALB/c yang diberi ekstrak etanol daun tumbuhan galing (*Cayratia trifolia* L. Domin). *Jurnal Medical Sains*, 3(2), pp.83–92.