

Potensi ekstrak daun flamboyan [*Delonix regia* (Boj. Ex Hook.) Raf.] terhadap peningkatan aktivitas dan kapasitas makrofag

*The potential of flamboyan leaf extract [*Delonix regia* (Boj. Ex Hook.) Raf.] against the increasing activity and capacity of macrofag*

Rosnizar Rosnizar*¹, Siti Maulida¹, Kartini Eriani¹, Suwarno¹

*¹Jurusan Biologi FMIPA Unsyiah, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia, Email: rosnizarjamil@gmail.com

Abstract: Activity and capacity of macrophage were the important factor to increase the immune system. Some of compound from plant such as Flamboyant leaves [*Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf.] contain flavonoids compounds that have been reported could increase the total of leukocyte and relative weight of mice spleens. This study was carried out to determine the potential effect of *D. regia* leaves as immunostimulant for mice (*Mus musculus*). This study used *Staphylococcus aureus* as an infection agent. This study used a complete randomized design with control (aquadest) (P_0), positive control (Stimuno) (P_1), *D. regia* leaves extracts dosages 250 mg/kg w (P_2), 500 mg/kg w (P_3) and 750 mg/kg w (P_4). Mice were given the extracts for 10 days by esophageal intubation and on 11th day were infected with *S. aureus* by intraperitoneal injection. Parameters observed were the number of macrophages which are active phagocytosis (activity phagocytosis of macrophages) and the number of bacteria which have been phagocytosed by activated macrophages (capacity phagocytosis of macrophages). The results showed that the *D. regia* leaves extracts at dosages 750 mg/kg w (P_4) had significant activity and capacity of macrophage phagocytosis higher than P_0 , P_1 , P_2 and P_3 treatments ($P < 0.05$). the study concluded that the *D. regia* leaves extracts at dosages 750 mg/kg w could increase activity and capacity phagocytosis of macrophages and has immunostimulant effect.

Keywords: *Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf, *staphylococcus aureus*, macrophage, capacity

Abstrak: Aktivitas dan kapasitas makrofag merupakan faktor penting dalam menjaga sistem imun dalam tubuh. Beberapa senyawa berasal dari tumbuhan seperti daun flamboyan [*Delonix regia* (Boj. ex hook.) Raf.] dilaporkan banyak mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai imunostimulan dan dilaporkan berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. Penelitian ini mengkaji tentang potensi daun flamboyan sebagai agen imunostimulan pada peritonium mencit (*Mus mucus*) yang diinfeksi dengan bakteri *staphylococcus aureus*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan dan lima ulangan yaitu kontrol negatif (akuades) (P_0), kontrol positif (Stimuno) (P_1), ekstrak daun flamboyan pada dosis 250 mg/kg bb (P_2), 500 mg/kg bb (P_3) dan 750 mg/kg bb (P_4). Mencit diberikan ekstrak selama 10 hari secara *intubasi esofagus* dan pada hari ke 11 diinfeksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* secara intraperitoneal. Jumlah makrofag yang aktif memfagositosis dan jumlah bakteri yang di fagosit menjadi parameter pengukuran. Hasil menunjukkan ekstrak daun flamboyan

pada dosis 750 mg/kg bb (P_4) memiliki nilai rata-rata aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag yang signifikan lebih tinggi berbanding P_0 , P_1 , P_2 , dan P_3 ($P < 0,05$). Dari hasil ini disimpulkan bahwa ekstrak daun flamboyan pada dosis 750 mg/kg bb mampu mempengaruhi dan meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag.

Kata Kunci: *Delonix regia*, *staphylococcus aureus*, makrofag, kapasitas

Pendahuluan

Sistem kekebalan atau imunitas merupakan suatu sistem pertahanan yang berfungsi untuk melawan antigen, seperti mikroorganisme atau patogen lainnya (Kusmardi *et al.*, 2007). Saat fungsi dan jumlah sel imun kurang memadai, maka diperlukan pemberian imunostimulan sebagai upaya untuk meningkatkan sistem imun tubuh. Imunostimulan merupakan cara untuk meningkatkan sistem imun tubuh dengan menggunakan bahan-bahan yang dapat merangsang kerja sistem imun (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Imunostimulan mampu meningkatkan sistem imun dengan berbagai cara, yaitu dengan meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag, meningkatkan jumlah dan aktivitas sel limfosit T, sel *natural killer* (NK) dan melepaskan interferon dan interleukin (Tjay dan Rahardja, 2007). Imunostimulan digunakan sebagai terapi tambahan untuk penyakit-penyakit yang disebabkan oleh organisme patogen, membantu meringankan gejala penyakit infeksi serta mempercepat proses penyembuhan (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Salah satu tanaman yang berperan sebagai imunostimulan adalah tanaman flamboyan [*Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf.]. Flamboyan merupakan jenis tanaman yang mudah tumbuh dan membutuhkan pencahayaan matahari untuk tumbuh dengan baik (Yusuf, 2011). Beberapa peneliti melaporkan bahwa tanaman flamboyan memiliki kandungan fitokimia yang bermanfaat untuk kesehatan. Menurut Kumar *et al.* (2013), flamboyan mengandung senyawa metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid dan tanin yang bermanfaat sebagai bahan obat. Adanya kandungan senyawa tersebut menyebabkan tanaman ini berkhasiat sebagai imunostimulan.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, Ainsyah (2015) melaporkan bahwa daun flamboyan memiliki efek imunostimulan terhadap peningkatan aktivitas fagositosis, leukosit total, dan berat organ limpa relatif yang diuji pada mencit menggunakan teknik bersihan karbon. Namun demikian, uji efektifitas daun flamboyan sebagai imunostimulan dengan teknik infeksi (*challenge infection*) menggunakan mikroorganisme, seperti bakteri belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan untuk melihat adanya peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag, sekaligus menguji ketahanan mencit yang telah diberikan ekstrak metanol daun flamboyan dengan cara menginfeksi menggunakan bakteri *S. aureus*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang menyeluruh mengenai efek imunostimulan daun flamboyan dalam meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag, selain juga dapat memberi gambaran yang menyeluruh mengenai efektifitas imunostimulan daun flamboyan sehingga dapat dijadikan sebagai produk fitofarmaka.

Metode penelitian

Proses pemeliharaan hewan coba

Hewan coba dipelihara di vivarium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Syiah Kuala. Mencit dipelihara di dalam kandang yang beralaskan sekam dan kawat jaring sebagai penutup. Pakan mencit yang diberikan berupa pelet 788-2. Mencit diberikan minum secara *ad libitum*. Pembersihan kandang serta penggantian sekam dilakukan dua kali dalam seminggu. Sebelum digunakan sebagai hewan coba, mencit diaklimatisasi selama satu minggu. Menurut Endharti (2007) aklimatisasi dilakukan untuk menyesuaikan hewan coba dengan lingkungannya, mengontrol kesehatan dan bobot badan serta

menyeragamkan makanannya. Setelah satu minggu, hewan coba dapat diberikan perlakuan.

Ekstraksi daun flamboyan [*Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf.]

Tanaman flamboyan diperoleh dari kawasan Darussalam, Banda Aceh. Sampel yang diambil berupa daun muda yaitu daun pada tangkai utama (*ptiolus*) ke 1-6 yang terhitung dari ujung ranting. Menurut Bergquist *et al.*, (2005) daun muda memiliki kandungan fitokimia yang lebih tinggi. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Widyawati *et al.*, (2013) yang menyatakan bahwa daun muda tumbuhan beluntas memiliki kandungan senyawa fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan daun tua. Ekstraksi daun flamboyan pada penelitian ini menggunakan metode maserasi, yang dimulai dengan memisahkan daun dari tangkainya. Selanjutnya dicuci dengan air sampai bersih dan dikering-anginkan. Proses pengeringan daun flamboyan dilakukan di udara terbuka selama 3 hari hingga daunnya kering. Daun yang telah kering kemudian ditimbang sebanyak 500 g, lalu dimasukkan ke dalam 7 liter metanol dan direndam selama 3x24 jam. Filtrat yang diperoleh dipisahkan dari pelarut dengan penguap putar (*rotary evaporator*) hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil ekstrak daun muda flamboyan ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian ditempatkan dalam botol tertutup dan disimpan dalam lemari pendingin.

Pemberian ekstrak daun *Delonix regia*

Proses pemberian ekstrak daun flamboyan dilakukan sebanyak satu kali dalam sehari pada pukul 15.00 WIB (kecuali perlakuan P₀ dan P₁). Pemberian ekstrak dilakukan selama 10 hari secara *intubasi esofagus*. Sebelum mencit diberikan ekstrak daun flamboyan, mencit ditimbang terlebih dahulu untuk menentukan jumlah ekstrak yang diberikan. Selanjutnya ekstrak daun flamboyan diberikan sesuai dengan dosis yang telah ditetapkan. Pemberian ekstrak dilakukan dengan menggunakan *insulin syringe* dan sonde.

Pembiakan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Bakteri *S. aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA UNSYIAH. Bakteri *S. aureus* yang akan digunakan diregenerasikan kembali pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah 24 jam masa inkubasi, koloni bakteri yang tumbuh dipindahkan ke dalam media NB cair secara aseptik menggunakan ose steril dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya 1 ml media NB diambil dan ditambahkan 9 ml media NB yang baru. Penghitungan jumlah sel bakteri menggunakan hemositometer setiap satu jam, hingga diperoleh konsentrasi sel bakteri sebesar 10⁹ sel/ ml. Kemudian media NB yang berisi sel bakteri dengan kepadatan 10⁹ sel/ ml disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Endapan (pellet) yang terbentuk selanjutnya disuspensikan dalam 1 ml NaCl fisiologis (Boerlin, 2003). Suspensi yang terbentuk selanjutnya digunakan dalam proses infeksi mencit.

Pengambilan cairan peritoneal mencit

Setelah sepuluh hari pemberian ekstrak daun flamboyan, pada hari ke sebelas semua mencit perlakuan disuntik dengan suspensi bakteri *S. aureus* sebanyak 100 µl secara intraperitoneal dan dibiarkan selama satu jam. Mencit dibunuh secara *dislocation cervicalis*, kemudian dilakukan pembedahan pada bagian perut dengan menggunakan gunting bedah dan pinset steril. Kulit bagian perut mencit dibuka dan selubung peritoneum dibersihkan menggunakan alkohol 70%. Setelah itu cairan peritoneal diaspirasi dengan menggunakan spuid 1 ml dan diambil 3-4 tetes (Febriansyah, 2009).

Penghitungan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag

Cairan peritoneal yang telah diambil kemudian dibuat preparat apus dengan cara menggesekkan kaca benda yang sudah berisi cairan peritoneal menggunakan kaca benda lain dengan sudut kemiringan 30°. Selanjutnya kaca benda dengan apusan cairan peritoneal difiksasi selama 5 menit menggunakan metanol, lalu diwarnai dengan pewarna Giemsa hingga tertutupi seluruh permukaan preparat apus dan dibiarkan selama 15 hingga 20

menit. Pewarna Giemsa diencerkan terlebih dahulu dengan akuades dengan perbandingan 1:9. Setelah 20 menit pewarnaan, preparat ulas dibilas menggunakan air dan dikeringkan di udara terbuka.

Setelah preparat kering, diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x40, dilakukan pengamatan morfologi sel makrofag, penghitungan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. Aktivitas fagositosis ditetapkan berdasarkan jumlah sel makrofag yang aktif melakukan proses fagositosis dalam 100 sel makrofag (Boerlin, 2003). Kapasitas fagositosis ditetapkan berdasarkan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditemukan (difagosit) di dalam makrofag pada 50 sel fagosit aktif (Okoli *et al.*, 2008). Bentuk sel makrofag diamati menggunakan pembesaran 1000x (Roitt, 1993). Formula penentuan nilai aktivitas dan kapasitas fagositosis adalah sebagai berikut.

$$\% \text{ Aktivitas} = \frac{\text{Jumlah makrofag aktif}}{100 \text{ sel makrofag}} \times 100 \%$$

Keterangan:

Makrofag Aktif = makrofag yang terdapat bakteri di dalamnya

Kapasitas = Total jumlah bakteri uji (dalam 50 sel makrofag aktif)

Analisis Data

Data hasil penelitian dari penghitungan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag ditentukan persebaran normal dengan uji normalitas dan analisis menggunakan Analisis varians (ANAVA) yang diolah secara statistik menggunakan *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 20.0*. Apabila terdapat pengaruh yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji Tukey (Dytham, 2011).

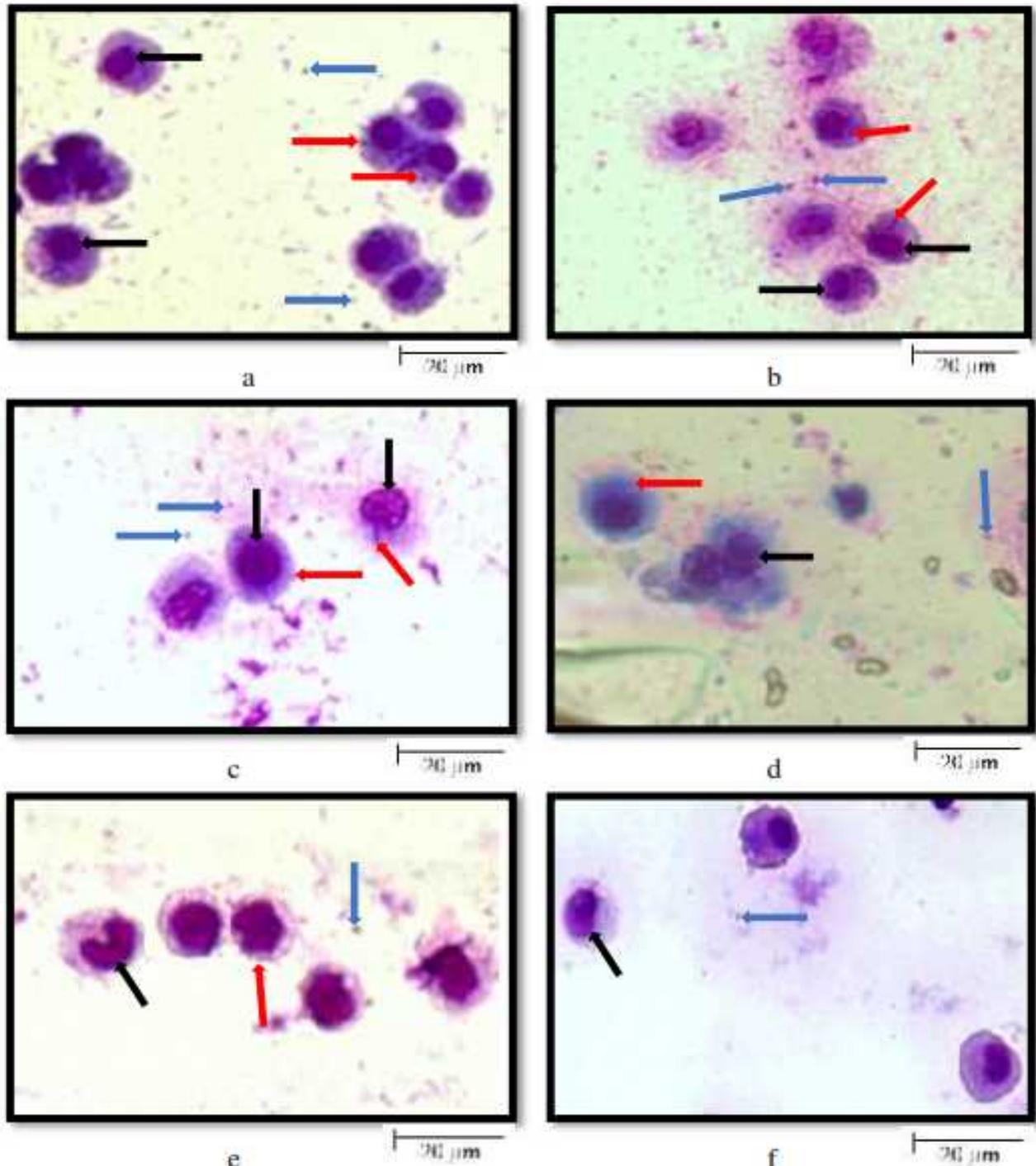
Hasil dan Pembahasan

a. Morfologi Sel Makrofag

Pengamatan terhadap bentuk sel makrofag dilakukan dengan menggunakan preparat apus yang

telah diwarnai dengan pewarna Giemsa dan diberi minyak emersi sebagai penjelas bentuk makrofag sehingga sel makrofag dapat terlihat dengan jelas. Hasil dari pewarnaan Giemsa menunjukkan adanya pewarnaan pada inti sel makrofag yang ditandai dengan perubahan warna menjadi ungu kebiruan (Gambar 4.1). Menurut Hadidjaja (1992) Giemsa merupakan zat warna yang terdiri dari eosin, metilen azur dan metilen blue yang memberi warna merah muda pada sitoplasma dan warna lembayung tua pada inti.

Berdasarkan hasil pengamatan preparat ulas yang dilakukan di bawah mikroskop, memperlihatkan sel makrofag berbentuk amoeboid (tidak beraturan) dan ukuran inti relatif lebih besar (Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Efendi (2003) bahwa makrofag berukuran 10-30 mm, bentuk tidak beraturan, inti lonjong atau berbentuk seperti ginjal, mengandung granula azurofilik dan terletak eksentris. Terkadang makrofag membentuk kaki-kaki palsu yang terjulur ke seluruh arah serta membran plasma berlipat-lipat, keadaan ini dapat membantu makrofag dalam melakukan perluasan fagositosis dan pergerakan sel. Djodibroto (2009) menambahkan bahwa sel makrofag memiliki diameter sebesar 15-50 μm dan di dalam sitoplasmanya terdapat granula berisi enzim yang berfungsi untuk mencerna mikroorganisme atau benda asing yang difagositosis. Menurut Playfair (2009) sel makrofag berukuran 5-10 kali lebih besar dibandingkan monosit. Selain itu, sel makrofag juga mengandung lebih banyak organel terutama lisosom dan memiliki beberapa granul serta melepaskan berbagai bahan, antara lain lisozim, komplemen, interferon, sitokin yang semuanya memberikan kontribusi dalam pertahanan nonspesifik dan spesifik. Menurut Murray *et al.*, (2016) menyatakan bahwa makrofag merupakan sel fagositik terbesar dan berumur panjang serta memiliki mitokondria. Hasil pengamatan morfologi sel makrofag di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x40 dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Morfologi makrofag peritoneum mencit yang diberi pewarnaan Giemsa (a) ekstrak *D. regia* dosis 750 mg/kg bb (b) ekstrak *D. regia* dosis 500 mg/kg bb (c) ekstrak *D. regia* dosis 250 mg/kg bb (d) kontrol positif (Stimuno dosis 455 mg/kg bb) (e) kontrol negatif (akuades) (f) makrofag tidak aktif (panah berwarna hitam menunjukkan bentuk inti sel makrofag, panah berwarna merah menunjukkan bakteri yang difagosit oleh sel makrofag aktif dan panah berwarna biru menunjukkan bakteri yang tidak difagosit oleh sel makrofag)

Peningkatan Aktivitas Fagositosis Makrofag

Penghitungan aktivitas fagositosis makrofag dilakukan untuk melihat peningkatan aktivitas sel makrofag aktif dalam menghancurkan antigen yang masuk ke dalam tubuh setelah diberikan ekstrak *D. regia*. Penghitungan aktivitas fagositosis makrofag ditetapkan berdasarkan jumlah sel makrofag yang aktif melakukan proses fagositosis dalam 100 sel makrofag (Boerlin, 2003). Hasil penghitungan aktivitas fagositosis sel makrofag peritoneum mencit dapat dilihat pada (Tabel 1).

Tabel 1. Nilai persentase aktivitas fagositosis makrofag dalam 100 sel makrofag

Perlakuan	% Aktivitas makrofag					% Mean \pm SD
	I	II	III	IV	V	
P ₀	88	87	88	89	89	88,2 \pm 0,836 ^(a)
P ₁	96	94	95	96	95	95,2 \pm 0,836 ^(c)
P ₂	91	92	91	93	92	91,8 \pm 0,836 ^(b)
P ₃	97	96	98	98	97	97,2 \pm 0,836 ^(d)
P ₄	99	98	99	100	100	99,2 \pm 0,836 ^(e)

Keterangan:

P₀: Perlakuan kontrol negatif (akuades)

P₁: Perlakuan kontrol positif pemberian sirup Stimuno dosis 455 mg/kg bb

P₂: Perlakuan pemberian ekstrak *D. regia* dosis 250 mg/kg bb

P₃: Perlakuan pemberian ekstrak *D. regia* 500 mg/kg bb

P₄: Perlakuan pemberian ekstrak *D. regia* 750 mg/kg bb

Tabel 1 di atas memperlihatkan rata-rata persentase aktivitas fagositosis makrofag yang diperoleh dari semua perlakuan, yaitu (P₀) 88,2 % \pm 0,836; (P₁) 95,2 % \pm 0,836; (P₂) 91,8 % \pm 0,836; (P₃) 97,2 % \pm 0,836 dan (P₄) 99,2 % \pm 0,836. Perlakuan P₀ hanya diberikan akuades sehingga aktivitas fagositosis hanya berasal dari imunitas alami hewan uji. Perlakuan P₁ sebagai kontrol positif, diberikan Stimuno dengan dosis 455 mg/kg bb sehingga aktivitas fagositosis selain berasal dari imunitas alami hewan uji juga dari pemberian Stimuno. P₁ memiliki rata-rata persentase aktivitas fagositosis yang lebih tinggi dibandingkan P₂. Hal ini dikarenakan P₂ diberikan ekstrak *D. regia* dengan dosis minimum (250 mg/kg bb) sehingga dosis ini kemungkinan belum mampu bekerja secara optimal dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Perlakuan kontrol positif (P₁) merupakan perlakuan dengan pemberian Stimuno yang mengandung ekstrak meniran yang telah teruji berkhasiat sebagai

imunomodulator sehingga memiliki rata-rata persentase yang lebih tinggi dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Namun, pemberian ekstrak *D. regia* pada dosis 500 mg/kg bb dan 750 mg/kg bb memiliki rata-rata persentase aktivitas fagositosis yang lebih tinggi daripada P₁. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *D. regia* dapat berfungsi sama seperti ekstrak meniran, yaitu berkhasiat sebagai imunomodulator. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Aldi *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa ekstrak etanol meniran dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dengan menggunakan metode bersihan karbon dan berkhasiat sebagai imunomodulator.

Berdasarkan Tabel 1 dapat dinyatakan bahwa rata-rata persentase aktivitas fagositosis tertinggi terdapat pada perlakuan P₄ yaitu sebesar 99,2 % sedangkan yang terendah terdapat pada perlakuan P₀ yaitu sebesar 88,2 %. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada perlakuan P₄ dikarenakan ekstrak *D. regia* dengan dosis 750 mg/kg bb merupakan dosis yang paling efektif yang dapat bekerja secara maksimum dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan berpotensi sebagai imunostimulan. Peningkatan aktivitas fagositosis juga dilaporkan oleh Ainsyah (2015) yang melakukan penelitian terhadap potensi ekstrak metanol daun flamboyan sebagai imunostimulan dengan dosis yang sama menggunakan metode bersihan karbon pada mencit *Swiss-Webster* dan Ainsyah mendapatkan bahwa dosis 750 mg/kg bb dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis dengan kategori kuat.

Hasil uji lanjut (Uji Tukey HSD) menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag pada semua perlakuan adalah berbeda nyata ($P < 0,05$). Urutan perbandingan rata-rata persentase aktivitas fagositosis makrofag dari yang tertinggi hingga yang terendah yaitu 99,2 % (P₄), 97,2 % (P₃), 91,8 % (P₁), 95,2 % (P₂) dan 88,2 % (P₀). Hasil uji Tukey HSD tersebut membuktikan bahwa perlakuan dosis tertinggi pada penelitian ini memiliki persentase aktivitas fagositosis makrofag yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada pemberian ekstrak *D. regia* dosis 750 mg/kg bb diduga akibat

kandungan senyawa fitokimia yang terkandung di dalamnya yaitu flavonoid. Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Yuswantina (2012) yang melaporkan bahwa kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag. Susilo (2012) juga melaporkan bahwa kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak daun jombang (*Taraxacum officinale*) mampu meningkatkan aktivitas imun pada masing-masing perlakuan.

Menurut Suhirman dan Winarti (2013) senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam tumbuhan berpotensi sebagai imunostimulan seperti senyawa flavonoid yang berperan dalam meningkatkan sistem imun tubuh dan mampu menangkal serangan bakteri, virus atau mikroorganisme lainnya. Hasil tersebut juga dilaporkan oleh Susanti *et al.* (2012) bahwa kandungan senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak kayu manis memiliki efek imunostimulan terhadap peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit yang diinfeksi dengan *Salmonella enteritidis*. Ulfah (2014) melaporkan bahwa ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mengandung senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai imunostimulan dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit. Kusmardi *et al.* (2007) menyatakan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) berpotensi terhadap kerja limfokin yang dihasilkan oleh sel T sehingga merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis. Selain itu, flavonoid mampu meningkatkan dan memperbaiki aktivitas sistem imun tubuh.

Menurut Watson *et al.* (2013) secara umum, sel limfosit T helper (Th) akan teraktivasi apabila terdapat respon imun terhadap antigen dengan cara berdiferensiasi menjadi sel Th efektor yang berbeda. Sel ini selanjutnya akan menghasilkan jenis sitokin yang berbeda pula tergantung pada jenis respon imunnya. Sel Th1 akan memproduksi interferon gamma (IFN- γ) dan interleukin-2 (IL-2) yang akan meningkatkan aktivasi sel makrofag, sel *natural killer* (NK) dan sel T sitotoksik (sel Tc). Mekanisme ini akan meningkatkan aktivitas fagositosis secara cepat untuk menghancurkan antigen dan

mikroorganisme intraseluler. Sel Th2 akan memproduksi beberapa jenis sitokin, seperti IL-4, IL-5, IL-13 yang akan merangsang pembentukan antibodi, mengaktivasi sel mast dan eosinofil untuk meningkatkan pertahanan terhadap antigen ekstraseluler. Mekanisme ini berperan dalam meningkatkan kemampuan pertahanan melawan reaksi alergi dan parasit. Namun demikian, berbeda dengan kondisi pada umumnya, senyawa flavonoid secara langsung dapat mengaktifkan efektor sel Th1 dan Th2 dalam memproduksi sitokin tanpa adanya respon imun terhadap antigen intraseluler maupun antigen ekstraseluler. Sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 dan Th2 juga dapat meningkatkan aktivasi makrofag, pembentukan antibodi serta sel-sel imun lainnya. Dengan demikian, senyawa flavonoid dapat meningkatkan kemampuan fagositosis secara cepat dalam menghancurkan antigen dan mikroorganisme intraseluler serta meningkatkan pertahanan terhadap antigen ekstraseluler.

Menurut Baratawidjaya (2006) kandungan flavonoid di dalam tumbuhan dapat mengaktivasi sel NK untuk merangsang produksi IFN- γ . IFN- γ yang diproduksi oleh berbagai sel imun merupakan sitokin utama dari *Macrophage Activating Cytokine* (MAC) yang berperan dalam imunitas non spesifik seluler. Samuel (2001) menambahkan makrofag dapat diaktifkan oleh IFN- γ dengan cepat dan efisien sehingga mengalami peningkatan aktivitas fagositosis dalam menghancurkan antigen.

Selain dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang berperan dalam sistem imun tubuh, ekstrak *D. regia* juga dapat berpengaruh terhadap perubahan toksikologi pada hewan coba jika diberikan dengan dosis yang berlebih. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Fitri (2015) menyatakan bahwa ekstrak metanol daun flamboyan pada dosis 2000, 3000, 4000, 5000 dan 6000 mg/kg dapat berpengaruh terhadap perubahan hati dan ginjal mencit. Oleh karena itu, dosis yang digunakan pada penelitian ini merupakan dosis yang efektif dan aman untuk digunakan.

Peningkatan Kapasitas Fagositosis Makrofag

Penghitungan kapasitas fagositosis makrofag dilakukan untuk melihat kemampuan makrofag

dalam melakukan fagositosis terhadap bakteri atau benda asing lainnya yang masuk ke dalam tubuh. Nilai kapasitas fagositosis makrofag ditetapkan berdasarkan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditemukan (difagosit) di dalam sel makrofag (panah berwarna merah pada Gambar 1) pada 50 sel fagosit aktif (Okoli *et al.*, 2008). Penggunaan bakteri *S. aureus* pada penelitian ini, yaitu sebagai antigen. *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang mampu mengikat pewarna Giemsa dengan jelas dan berbentuk bulat (kokus) yang memudahkan saat penghitungan kapasitas fagositosis makrofag. Hasil penghitungan kapasitas fagositosis makrofag peritoneum mencit dapat dilihat pada (Tabel 2).

Hasil penghitungan kapasitas fagositosis makrofag memperlihatkan bahwa nilai rata-rata kapasitas fagositosis makrofag yang diperoleh pada semua perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda. Nilai rata-rata kapasitas fagositosis makrofag pada perlakuan P₀; P₁; P₂; P₃; P₄ secara berturut-turut adalah 294 ± 2,236; 464,8 ± 3,114; 415,8 ± 1,923; 507 ± 2,549; 554,4 ± 2,701. Perbandingan rata-rata nilai kapasitas fagositosis makrofag yang diperoleh pada Tabel 2 serupa dengan perbandingan rata-rata persentase aktivitas fagositosis makrofag (Tabel 1). P₁ (kontrol positif) memiliki rata-rata kapasitas fagositosis yang lebih tinggi dibandingkan P₂ (EDF dosis 250 mg/kg bb). Namun, pemberian ekstrak *D. regia* pada dosis 500 mg/kg bb (P₃) dan 750 mg/kg bb (P₄) memperoleh rata-rata kapasitas fagositosis makrofag yang lebih tinggi daripada rata-rata kapasitas fagositosis makrofag yang diperoleh perlakuan P₁. Perlakuan P₁ merupakan perlakuan dengan pemberian Stimuno yang telah teruji berkhasiat sebagai imunomodulator. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *D. regia* pada dosis 500 mg/kg bb dan 750 mg/kg bb berpotensi sebagai imunostimulator.

Hasil penghitungan nilai rata-rata kapasitas fagositosis makrofag yang diperoleh pada Tabel 2 dapat dinyatakan bahwa rata-rata kapasitas fagositosis makrofag tertinggi terdapat pada perlakuan P₄ (pemberian EDF dosis 750 mg/kg bb) yaitu sebesar 554,4 dan perlakuan terendah terdapat pada P₀ (pemberian akuades) yaitu sebesar 294. Hal ini dikarenakan perlakuan P₀ tidak diberi bahan yang

berkhasiat sebagai imunostimulan sehingga nilai kapasitas fagositosis makrofag lebih rendah dibandingkan perlakuan lainnya. Perlakuan P₄ telah diberikan bahan (EDF) yang berkhasiat sebagai imunostimulan, selain itu, P₄ merupakan dosis optimum pada penelitian ini, yang dapat bekerja secara maksimum dalam meningkatkan kapasitas fagositosis makrofag sehingga rata-rata kapasitas fagositosis makrofag yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya (P₀, P₁, P₂ dan P₃). Hasil ini didukung oleh Chairul dan Pratiwi (2012) yang melaporkan bahwa ekstrak temu-temuan (Zingiberaceae) pada dosis optimum dapat meningkatkan kapasitas fagositosis makrofag peritoneum mencit yang diinfeksi dengan bakteri *S. epidermidis*.

Tabel 2. Nilai kapasitas fagositosis makrofag peritoneum mencit (total jumlah bakteri *S. aureus* dalam 50 sel makrofag aktif

Perlakuan	Kapasitas makr					Mean ± SD
	I	II	III	IV	V	
P ₀	294	295	297	293	291	294 ± 2.236 ^(a)
P ₁	460	464	468	465	467	464.8 ± 3.114 ^(c)
P ₂	418	416	415	417	413	415.8 ± 1.923 ^(b)
P ₃	509	504	510	505	507	507 ± 2.549 ^(d)
P ₄	553	551	554	556	558	554.4 ± 2.701 ^(e)

Keterangan:

P₀: Perlakuan kontrol negatif (akuades)

P₁: Perlakuan kontrol positif pemberian sirup Stimuno dosis 455 mg/kg bb

P₂: Perlakuan pemberian ekstrak *D. regia* dosis 250 mg/kg bb

P₃: Perlakuan pemberian ekstrak *D. regia* dosis 500 mg/kg bb

P₄: Perlakuan pemberian ekstrak *D. regia* dosis 750 mg/kg bb

Hasil uji normalitas menggunakan SPSS 20.0. memperlihatkan bahwa data kapasitas fagositosis makrofag yang diperoleh adalah tersebar normal ($P > 0,05$). Analisis varian (ANAVA) menunjukkan terdapat pengaruh yang nyata pada setiap perlakuan ($P < 0,05$). Hasil uji Tukey HSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada semua perlakuan. Urutan perbandingan nilai kapasitas fagositosis makrofag dari yang tertinggi hingga yang terendah adalah 554,4 (P₄), 507 (P₃),

464,8 (P₁), 415,8 (P₂), 294 (P₀). Hasil ini membuktikan bahwa dosis tertinggi pada penelitian ini memiliki efek imunostimulan terhadap peningkatan kemampuan makrofag dalam memfagosit bakteri *S. aureus*.

Makrofag merupakan bagian dari kekebalan bawaan dengan banyak peran, yaitu mulai dari respon primer terhadap patogen, homeostatis jaringan, penyembuhan dan perbaikan jaringan. Makrofag mampu mengenali bakteri melalui sejumlah reseptor yang dimilikinya (Martinez, 2011). Makrofag mengenali bakteri target melalui reseptor CD14 yang terdapat pada permukaan sel makrofag. Makrofag mampu mengenali polisakarida kompleks lipopolisakarida (LPS) dan LPS-binding protein (LBP) serta berperan penting dalam proses fagositosis terhadap bakteri yang hidup. Pengikatan bakteri oleh reseptor yang terdapat pada membran makrofag merupakan langkah awal terjadinya fagositosis (Yates *et al.*, 2007). Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh sel-sel fagosit dengan cara mencerna bakteri atau benda asing lainnya yang masuk ke dalam tubuh. Selain terjadi internalisasi bakteri, juga memicu aktivasi sel makrofag untuk mensintesis berbagai enzim (*reactive oxygen intermediate, inducible nitric oxide synthase dan lysosomal protease*) dan sitokin (IL-1 dan TNF-) yang bersifat toksik terhadap bakteri yang difagosit (Keisari *et al.*, 1997).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa: ekstrak metanol daun flamboyan dengan dosis 750 mg/kg bb dapat meningkatkan aktivitas serta kapasitas fagositosis makrofag peritoneum mencit. Oleh karena itu, ekstrak metanol daun flamboyan pada dosis 750 mg/kg bb dapat bertindak sebagai imunostimulator.

Daftar Pustaka

- Ainsyah. 2015. Uji Efek Imunostimulan Ekstrak Methanol Daun Flamboyan [*Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf] terhadap Peningkatan Sel-Sel Imun Mencit Strain Swiss-Webster. *Skripsi*. Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.
- Aldi, Y., Rasyadi, Y., Handayani, D. 2014. Aktivitas Imunomodulator dari Ekstrak Etanol Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) terhadap Ayam Broiler. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 1 (1): 20-26.
- Arvin, K.B. 1999. *Ilmu Kesehatan Anak Edisi 15*. Terjemahan dari Nelson Textbook of Pediatrics 15/E, oleh A. Semik Wahab. EGC, Jakarta.
- Astawan, M. dan Kasih, A. L. 2008. *Khasiat Warna-Warni Makanan*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Baratawidjaja, G. K. 2006. *Penggunaan Herbal Medisin untuk Imunostimulator dan Kemopreventif*. FKUI, Jakarta.
- Baratawidjaja, G. K. dan Rengganis, I. 2012. *Imunologi Dasar Edisi 10*. FKUI, Jakarta.
- Bell, A. L. 2007. *Human Histology*. University of New England College of Osteopathic Medicine <http://humanbody.homestead.com/histology.html>
- Bergquist, S.A.M., Gertsson, U.E, Knuthsen, P. and Olsson, M.E. 2005. Flavonoids in Baby Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Changes During Plant Growth and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (24): 9459-9464.
- Besung, I. N. K. 2011. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) dalam Meningkatkan Kapasitas Fagosit Makrofag Peritoneum Mencit terhadap *Salmonella typhi*. *Buletin Veteriner Udayana*. 3 (2): 71-78.
- Boerlin, P., Kunhert P., Hussy E. D. and Schaeiliubaum, M. 2003. Methods for Identifications of *Staphylococcus aureus* Isolated in Cases of Bovine Mastitis. *Journal of Clinical Microbiologi*. 767-771.
- Bone, K. and Mills, S. 2013. *Principles and Practice of Phytotherapy Modern Herbal Medicine*. Elsevier, USA.
- Carter, G. R and Wise, D. J. 2004. *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology Sixth Edition*. Iowa State Press, USA.
- Chairul dan Pratiwi. 2012. *Efektivitas Imunomodulator Tiga Jenis Zingiberaceae secara In vitro Melalui Pengukuran Aktivitas Sel Makrofag dan Kapasitas Fagositosis*. Puslit Biologi LIPI, Cibinong.

- Corwin, E.J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Terjemahan dari Handbook of Pathofisiology, oleh Egy Komara, Esty Wahyuningsih, Devi Yulianti dan Pamilih Eko Karyuni. EGC, Jakarta.
- Djojodibroto, R.D. 2009. *Respirologi*. EGC, Jakarta.
- Dwijoseputro. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djambatan, Jakarta.
- Dytham, C. 2011. *Choosing and Using Statistics: A Biologist's Guide*. Wiley-Blackwell, UK.
- Efendi, Z. 2003. *Daya Fagositosis Makrofag pada Jaringan Longgar Tubuh*. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Sumatera Utara.
- Endharti, A. T. 2007. Aktivasi Spontan Sel T Limfosit Mencit yang Mengalami Defisiensi IL-2R. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol XXIII No 1.
- Febriansyah, A. R. 2009. Uji Efek Imunomodulator Ekstrak Metanol Daun dan Kulit Batang *Rhodamnia cinerea* Jack melalui Pengukuran Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritoneum Mencit yang Diinduksi *Staphylococcus epidermis* secara *In Vitro*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Fitri, F. 2015. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun Flamboyan [*Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf.] terhadap Mencit Strain Swiss-Webster. *Skripsi*. Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.
- Guyton, A. C. 1994. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Terjemahan dari Textbook of Medical Physiology, oleh LMA. Ken Ariata Tengadi. EGC, Jakarta.
- Hadidjaja, P. 1992. *Penuntun Praktikum Parasitologi Kedokteran*. FKUI, Jakarta.
- Hangerman, A. E. 2002. *Tannin Handbook*. Department of Chemistry and Biochemistry. Miami University, Florida.
- Jawetz, E., Melnick and Adelberg, E. A. 2005. *Mikrobiologi kedokteran*. Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Keisari, Y. Kabha, K. Schlepper, S. J. Ofek, I. 1997. Phagocyte Bacteria Infections. *Advances in Dental Research*. 11 (1): 43-49.
- Kumar, A. R., Rijwana, S. and Yeshwanth, D. 2013. Phytochemical Evaluation of *Delonix regia*, *Samanea saman*, *Bauhinia variegata*. *Internasional Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*. 3 (4): 2231-278.
- Kusmardi., Kumala, S., Triana, E. E. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. *Jurnal Makara Kesehatan*. 10 (2): 89-93.
- Kusmardi., Kumala, S., Triana, E. E. 2007. Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. *Jurnal Makara Kesehatan*. 11 (2): 50-53.
- Martinez, F.O. 2011. Regulators of Macrophage Activation. *Eur J Immunology*. 41 (6): 1531-34.
- Morton, P. G. 2003. *Panduan Pemeriksaan Kesehatan Edisi 2 dengan Dokumentasi SOAPIE*. Terjemahan dari David's Clinical Guide to Health Assesment 2/E, oleh Sari Kurnianingsih. EGC, Jakarta.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. 2016. *Medical Microbiology Eighth Edition*. Elsevier, Philadelphia.
- Nohong. 2009. Skrining Fitokimia Tumbuhan *Ophiopogon jaburan* Lodd dari Kabupaten Kolaka Provinsi Sulawesi Tenggara. *Jurnal Pembelajaran Sains*. 5(2): 172-178.
- Okoli, C. O., Akah, P. A., Onuoha, N. J., Okoye, T. C. 2008. *Acanthus montanus: an Experimental Evaluation of the Antimicrobial, Anti-inflammatory and Immunological Properties of a Traditional Remedy for Furuncles*. BMC Complementary and Alternative Medicine <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/8/27>.
- Playfair, J. H. L dan Chain, B. M. 2009. *At a Glance Immunologi Edisi kesembilan*. Terjemahan dari Immunologi At a Glance Ninth Edition oleh Winardini. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Relita, Y. M. 2013. Pengaruh Ekstrak Buah dan Daun *Delonix regia* terhadap Densitas *Plasmodium Berghei* pada Mencit Swiss-Webster *In Vivo*. *Skripsi*. Universitas Indonesia, Jakarta.

- Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. 1993. *Immunology 3rd Edition*. Mosby International, London.
- Samuel, C. E. 2001. Antiviral Actions of Interferon. *Clinical microbial*. 14(4): 778-809.
- Sell, C. 2003. *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*. Royal Society of Chemistry, USA.
- Shanmukha, I. Harshil, P., Jignesh, P. and Riyazunnisa. 2011. Quantification of Total Phenol and Flavonoid Content of *Delonix regia* Flowers. *International of Chemtech Research* 3(1): 280-283.
- Sitohang, P. 1996. Potensi Tumbuhan Obat di Daerah Penangan hingga Kebon Segoro. *Skripsi*. Institute Pertanian Bogor, Bogor.
- Spach, D. H. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus MRSA Skin And Soft Tissue Infections*. <http://www.hivwebstudy.org/Cases/dermatologi-c-manifestations/methicillin-resistant-Staphylococcus-aureus-mrsa-skin-and-soft>). Tanggal akses 23 Februari 2015.
- Suharni. 2004. Pengaruh Jus *Aloe vera* terhadap Kemampuan Fagositosis Makrofag dan Produksi Nitric Oxide Mencit BALB/c yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Semarang.
- Suhirman, S. dan Winarti, C. 2013. Prospek dan Fungsi Tanaman Obat sebagai Imunomodulator. *Jurnal Penelitian*, 121-122.
- Sumardjo, D. 2008. *Pengantar Kimia-Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. EGC, Jakarta.
- Susanti, P.A. Trisunuwati, P. Murwani, S. 2012. *Pengaruh Ekstrak Etanol Kayu Manis (Cinnamomum Burmanii) terhadap Peningkatan GR-1 yang mengekspresikan IFN- dan Aktivitas Fagositosis Makrofag*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Bratawijaya, Malang.
- Susilo, J. 2012. Efek Imunomodulator Fraksi Etil Asetat Daun Jombang (*Taraxacum officinale* Weber et Wiggers) terhadap Respon Imun Nonspesifik pada Mencit Jantan Galur Balb/C. *Skripsi*. STIKES Ngudi Waluyo, Ungaran.
- Tjay, T. H., dan Rahardja, K. 2007. *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya*. Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Ulfah, M. 2014. Uji Aktivitas Imunostimulan Fraksi Asetat Ekstrak Etanol Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Proliferasi Sel Limfosit Mencit Galur Swiss secara *In vitro* Beserta Identifikasi Kandungan Senyawa Kimianya. *Skripsi*. Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
- United States Department of Agriculture. *National Plant Data Center, Natural Resources Conservation Service, USA Available*. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>. Tanggal akses 14 April 2014.
- Wagner, H. 2000. Immunomodulatory Agents from Plants. *Indian Journal of Experimental Biology*. 38 (2): 199-200.
- Watson, R. R and Preedy, V.R. 2013. *Bioactive Food as Dietary interventions for arthritis and Related Inflammatory Diseases*. Academic Press, UK.
- Widjaja, H., Riwanto, I., Dharmana, E. 2012. Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag dan Kadar Vitamin C dalam Cairan Intraperitoneal Mencit Balb/C dengan Sepsis. *Medica Hospitalia*. 1 (2): 123-126.
- Widyawati, P.S., Wijaya, C.H., Hardjosworo, P.S., Sajuthi, D. 2013. *Evaluasi Aktivitas Antioksidatif Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea indica) Berdasarkan Perbedaan Ruas Daun*. Fakultas Teknologi Pertanian Unika Widya Mandala Surabaya, Surabaya.
- Wiedosari, E. 2007. Peranan Imunomodulator Alami (*Aloe vera*) dalam Sistem Imunitas Seluler dan Humoral. *Wartazoa*. 12(4): 143-152.
- Wirakusumah, E. S. 2007. *Jus Buah dan Sayuran*. Penerbit Swadaya, Jakarta.
- Yarnell, E. L. 2003. Photochemistry and Pharmacy for Practitioners of Botanical Medicine. *Healing Motivation Publishing*. 5(7): 41-119.
- Yates, R.M. Hermetter, A. Taylor, G.A. Russell, D.G. 2007. Macrophage Activation Downregulates the Degradative Capacity of the Phagosome. *Traffic*. 8 (3): 241-50.

- Yuliarti, N. 2009. *A to Z Food Supplement*. Penerbit ANDI, Yogyakarta.
- Yusuf, H. 2011. *Informasi Singkat Benih Delonix regia* (Boj. Ex Hook) Raf. BPTH Sulawesi, Sulawesi.
- Yuswantina, R. 2012. Efek Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park) Fosberg) terhadap Respon Imun Non Spesifik pada Mencit Jantan Galur Balb/C. *Skripsi*. STIKES Ngudi Waluyo, Ungaran.
- Yuwono. 2012. *Staphylococcus aureus* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Departemen Mikrobiologi FK Universitas Sriwijaya, Palembang.