

Correlation Between Total Flavonoid Contents and Macrophage Phagocytosis Activity of Fractions From Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) Barks Ethanolic Extract *In Vitro*

Korelasi Antara Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Faloak (*Sterculia quadrifida* R. Br.) Secara *In Vitro*

Rima Munawaroh^{1,2}, Siswadi³, Erna Prawita Setyowati², Retno Murwanti², Triana Hertiani^{2*}

¹Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Balai Penelitian Lingkungan Hidup dan Kehutanan Kupang, Kupang

ABSTRACT

On Timor island, Nusa Tenggara Timur, faloak barks (*Sterculia quadrifida* R.Br.) has been used empirically to restore stamina. Faloak bark ethanolic extract proved to have immunomodulatory activity *in vitro*, which can increase macrophage phagocytosis activity. This research aimed: (i) to determine the immunomodulatory active fraction of faloak bark ethanolic extract, (ii) to determine the total flavonoid contents of faloak extract and fractions, and (iii) to evaluate the correlation of the total flavonoid contents of those extract and fractions with their macrophage phagocytosis activity. The *simplicia* powder is macerated with 96% ethanol. The extract was dissolved in methanol:water (9:1v/v) was then subsequently partitioned with *n*-hexane, ethyl acetate, and water to obtain *n*-hexane fraction, ethyl acetate fraction, water fraction, and insoluble fraction. Faloak extract and fractions at concentration 62,5; 125; 250; 500 µg/mL were tested for their effect on the peritoneal macrophage phagocytosis of Balb/c mice *in vitro* by the latex beads method. Phagocytosis capacity and phagocytosis index were analyzed using one-way anova and post hoc Tukey HSD test with 95% confidence level. The results showed that ethyl acetate fraction had the highest macrophage phagocytosis capacity and the highest total flavonoid content compared to other fractions. The highest macrophage phagocytosis capacity of ethyl acetate fraction at concentration of 250 µg/mL was 51,94±4,67%, this value was significantly different from cell control (7,50±1,29%), negative controls of 0,0625% dimethylsulphoxide (6,25±0,36%), as well as positive control of 200 µg/mL echinaceae extract syrup® (9,97±0,33%). The total flavonoid content of ethyl acetate fraction determined by aluminum chloride method was 4,290±0,029 mg of quercetin equivalent/g fraction. There was a positive and strong correlation between the total flavonoid content of these extract and fractions with their macrophage phagocytosis capacity (Pearson correlation coefficient of 0,781) and showing linear relationship $y=4,721x+19,663$; $R^2=0,61$.

Keywords: *Sterculia quadrifida*, faloak bark, macrophage phagocytosis, total flavonoids

ABSTRAK

Di pulau Timor, Nusa Tenggara Timur, kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) telah digunakan secara empiris untuk memulihkan stamina. Ekstrak etanolik kulit batang faloak terbukti mempunyai aktivitas imunomodulator *in vitro*, yaitu dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Penelitian ini bertujuan untuk : (i) menentukan fraksi aktif sebagai imunomodulator dari ekstrak etanolik kulit batang faloak, (ii) menetapkan kadar flavonoid total dari ekstrak dan fraksi faloak, serta (iii) menentukan hubungan antara kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi faloak dengan aktivitas fagositosis makrofagnya. Serbuk *simplicia* dimaserasi dengan etanol 96%. Ekstrak kental dilarutkan dalam metanol:air (9:1v/v) kemudian dipartisi berturut-turut dengan *n*-heksana, etil asetat, dan air sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, dan fraksi tidak larut. Ekstrak dan fraksi faloak pada konsentrasi 62,5; 125; 250; 500 µg/mL diuji pengaruhnya terhadap fagositosis makrofag peritoneal mencit Balb/c

*Corresponding author : Triana Hertiani
Email : hertiani@ugm.ac.id

secara *in vitro* dengan metode latex beads. Data kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis dianalisis menggunakan anova satu arah dan post hoc test Tukey HSD dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai kapasitas fagositosis makrofag dan kadar flavonoid total paling tinggi dibandingkan fraksi yang lain. Kapasitas fagositosis makrofag tertinggi fraksi etil asetat yaitu pada konsentrasi 250 µg/mL sebesar 51,94±4,67%, nilai ini berbeda bermakna dengan kontrol sel (7,50±1,29%), kontrol negatif dimetilsulfoksida 0,0625% (6,25±0,36%), maupun kontrol positif sirup ekstrak echinaceae® 200 µg/mL (9,97±0,33%). Kadar flavonoid total fraksi etil asetat yang ditetapkan dengan metode aluminium klorida adalah 4,290±0,029 mg ekivalen kuersetin/g fraksi. Terdapat korelasi yang positif dan kuat antara kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi faloak dengan kapasitas fagositosis makrofagnya (koefisien korelasi Pearson 0,781) serta menunjukkan hubungan linier $y=4,721x+19,663$; $R^2 = 0,61$.

Kata kunci : *Sterculia quadrifida*, kulit batang faloak, fagositosis makrofag, flavonoid total

PENDAHULUAN

Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) merupakan salah satu tanaman obat yang digunakan oleh masyarakat di pulau Timor, Nusa Tenggara Timur (NTT) secara turun temurun. Siswadi *et al.* (2013) melakukan studi etnobotani kulit batang faloak di daerah NTT dan dilaporkan bahwa kulit batang faloak dimanfaatkan sebagai obat untuk penyakit hati, kanker, gastroenteritis, diabetes, rematik, dan penguat sel darah merah. Siswadi (2015) juga menyebutkan bahwa kulit batang faloak digunakan untuk pengobatan sakit pinggang, ginjal, pembersih darah setelah melahirkan, dan memulihkan stamina.

Pemanfaatan kulit batang faloak untuk berbagai macam pengobatan memungkinkan adanya efek pengobatan melalui mekanisme imunomodulator. Herba atau tanaman yang telah digunakan secara luas dalam etnofarmakologi merupakan sumber imunomodulator yang potensial (Yeap *et al.*, 2011), misalnya ekstrak zat pedas dari rimpang jahe emprit (*Zingiber officinale*) dan senyawa zerumbon dari rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet*) mempunyai aktivitas imunostimulator (Mellawati *et al.*, 2010; Keong *et al.*, 2010).

Ekstrak air, ekstrak etanolik 50%, dan ekstrak etanolik 96% kulit batang faloak terbukti memiliki aktivitas imunomodulator secara *in vitro*, yaitu dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag tetapi tidak dapat meningkatkan proliferasi limfosit (Winanta, 2017). Penggunaan pohon faloak yang tumbuh pada ketinggian ≤300 m di atas permukaan laut dan berdiameter antara >15-30 cm diperoleh ekstrak kulit batang faloak dengan rendemen tertinggi dan kadar flavonoid total tertinggi (Siswadi, 2015). Flavonoid telah dilaporkan memodulasi makrofag yang terkait dengan inflamasi (Chirumbolo, 2010).

Berdasarkan studi pustaka yang dilakukan penulis belum diketahui fraksi aktif dari ekstrak kulit batang faloak sebagai imunomodulator dan belum pernah dilakukan penelitian yang

mengevaluasi hubungan antara kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi kulit batang faloak dengan aktivitas imunomodulatornya. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk : (i) menentukan fraksi aktif sebagai imunomodulator dari ekstrak etanolik kulit batang faloak, (ii) menetapkan kadar flavonoid total dari ekstrak dan fraksi faloak, serta (iii) menentukan hubungan antara kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi faloak dengan aktivitas fagositosis makrofagnya.

METODOLOGI

Alat dan bahan

Alat penelitian yaitu rotary evaporator (Stuart), waterbath (Memmert), corong pisah, lampu UV 254 nm dan UV 366 nm, Camag Linomat 5, oven (Memmert), timbangan analitik (Ohaus), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1700), sentrifus, mikropipet, inkubator CO₂ (Heraeus), laminar air flow (Nuair), hemositometer (Newbauer), mikroskop cahaya (Olympus CX 21), kamera digital (Canon Ixus 275 HS).

Bahan penelitian yaitu: kulit batang faloak dikumpulkan oleh Balai Penelitian Lingkungan Hidup dan Kehutanan Kupang pada bulan Maret tahun 2016; pelarut berderajat teknis (etanol 96 %, metanol, n-heksana, etil asetat); pelarut berderajat pro analisis (etanol, metanol, n-heksana, aseton, asam formiat, kloroform, dimetilsulfoksida (DMSO)); aluminium klorida (AlCl₃) anhidrat (Sigma); kuersetin anhidrat (Sigma); plat KLT RP C-18 F₂₅₄S; reagen semprot anisaldehyda-H₂SO₄; mencit Balb/c jantan usia 2-3 bulan; media Rosewell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Sigma); natrium bikarbonat (NaHCO₃) (Sigma); hepes; fetal bovine serum (FBS); penisilin, streptomisin, dan amfoterizin B (Gibco); phosphate-buffered saline (PBS); latex beads (Sigma) diameter 3 µm; cat Giemsa; cover slips bulat; microplate 24 well (Iwaki); produk-X®(sirup ekstrak echinaceae). Kelaikan etik penelitian mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas

Kedokteran UGM dengan nomor persetujuan KE/FK/0993/EC/2017.

Jalannya penelitian

Pengumpulan dan identifikasi bahan

Kulit batang faloak dipanen dari pohon yang berdiameter >15-30 cm dan tumbuh pada ketinggian \leq 300 m di atas permukaan laut. Tumbuhan faloak diidentifikasi di Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

Pembuatan serbuk simplisia kulit batang faloak

Kulit batang faloak yang paling luar dikikis untuk menghilangkan kotoran kemudian dirajang 0,5-1 cm dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan hingga cukup kering di Balai Penelitian Lingkungan Hidup dan Kehutanan Kupang. Pengeringan dilanjutkan dalam oven suhu 50°C selama 21 jam di Fakultas Farmasi UGM. Kulit batang yang sudah kering dibuat serbuk menggunakan grinder/ penggiling.

Ekstraksi kulit batang faloak menggunakan metode maserasi

Serbuk kulit batang faloak \pm 2 kg direndam dalam 12 L etanol 96% selama 24-48 jam dengan mengaduk sebanyak 6 kali @ 5 menit. Serbuk dimaserasi sebanyak 6 kali. Maserat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental.

Fraaksinasi ekstrak etanolik kulit batang faloak

Setiap 5 g ekstrak kental kulit batang faloak dilarutkan dalam 50 ml metanol-air (9:1 v/v) kemudian dipartisi cair-cair menggunakan 50 ml n-heksana sampai fase n-heksana jernih (6 kali partisi). Fase n-heksana dipisahkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* suhu 50°C. Fase metanol-air diuapkan menggunakan *waterbath* suhu 60°C sampai kental kemudian disuspensikan dalam akuades. Tiap 100 ml suspensi dipartisi cair-cair menggunakan etil asetat 100 ml sampai fase etil asetat jernih (5 kali partisi). Fase etil asetat dipisahkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* suhu 50°C. Fase air disaring untuk memisahkan bahan yang tidak larut. Fase air diuapkan menggunakan *freeze drying* di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM. Bahan yang tidak larut dilarutkan dalam etanol 96% dan diuapkan menggunakan *waterbath* suhu 60°C.

Profil KLT ekstrak dan fraksi kulit batang faloak

Ekstrak dan fraksi dibuat stok dengan konsentrasi 10 mg/mL. Masing-masing sampel ditotolkan pada fase diam RP C-18 F₂₅₄S

menggunakan Camag Linomat 5 sebanyak 5 μ L kemudian dielusi menggunakan fase gerak air : aseton : asam formiat (5:20:1 v/v/v). Bercak dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm serta reagen semprot anisaldehid-H₂SO₄ (dioven 110°C selama 5 menit, diamati di sinar tampak).

Isolasi dan kultur sel makrofag peritoneal (Hartini et al., 2013)

Makrofag diisolasi dari mencit Balb/c jantan usia 2-3 bulan. Mencit dikorbankan menggunakan kloroform, selanjutnya mencit diletakkan di atas papan dengan posisi terlentang. Bagian dada sampai perut mencit dibasahi dengan alkohol 70% kemudian dibuat irisan dan dibuka bagian perutnya. Selubung peritoneum dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Makrofag diisolasi dari cairan peritoneal mencit dengan menyuntikkan 10 mL medium RPMI 1640 dingin ke dalam rongga peritoniumnya, sambil digoyang-goyang perlahan selama 5 menit agar makrofag yang menempel dalam rongga peritoneum dapat terlepas dan tersuspensi ke dalam media. Cairan peritonium kemudian dikeluarkan dan disentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit kemudian ditambahkan 3 mL medium RPMI-1640 komplet (mengandung FBS 10% v/v) pada sedimen pelet. Sel dihitung dengan hemositometer dan kemudian diresuspensi dalam medium RPMI komplet untuk menghasilkan suspensi sel dengan kepadatan 2,5x10⁶ sel/mL. Suspensi sel diinokulasi pada 24-well plate yang telah diberi *cover slips* bulat, setiap sumuran 200 μ L (5x10⁵ sel), didiamkan selama 30 menit, kemudian ditambah medium RPMI komplet 800 μ L/sumuran dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama 24 jam.

Uji aktivitas fagositosis makrofag secara in vitro menggunakan metode latex beads (Hartini et al., 2013)

Setelah sel makrofag dikultur selama 24 jam, media diambil menggunakan pipet sehingga tinggal makrofag dalam *coverslips*. Bahan uji baik seri konsentrasi sampel (ekstrak dan fraksi 62,5; 125; 250; 500 μ g/mL), kontrol sel, kontrol pelarut (DMSO 0,0625%; 0,125%; 0,25%; 0,5%) maupun kontrol positif (sirup ekstrak echinaceae® 100 dan 200 μ g/mL) ditambahkan sebanyak 500 μ L/sumuran, masing-masing dengan 3 kali replikasi (3 *coverslips*) kemudian diinkubasi selama 4 jam di dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C. Bahan uji diambil menggunakan pipet dan dicuci 1 kali dengan medium RPMI-1640. Suspensi lateks dengan konsentrasi 2,5x10⁷/mL dalam medium RPMI komplet ditambahkan sebanyak

200 μL ke dalam masing-masing sumuran, diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% suhu 37°C selama 60 menit. Sel dicuci dengan PBS 2 kali untuk menghilangkan kelebihan *latex beads* yang tidak terfagositosis kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Metanol dibuang dan *coverslips* dibiarkan sampai kering kemudian diwarnai dengan Giemsa 10% dalam akuades selama 20 menit, dicuci dengan akuades sampai bersih (3-4 kali), dan dikeringkan pada suhu kamar. Jumlah makrofag yang memfagositosis lateks dan jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag aktif dihitung dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x pada beberapa lapang pandang sehingga jumlah makrofag yang diamati sekitar 100 makrofag.

Aktivitas fagositosis makrofag dinilai dari kapasitas fagositosis dan indeks fagositosis seperti yang dilakukan oleh Jensch-Junior *et al.* (2006). Kapasitas fagositosis adalah jumlah makrofag yang aktif memfagositosis lateks tiap 100 makrofag (satuan %). Indeks fagositosis adalah jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag aktif.

Penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode AlCl_3

Kadar flavonoid total di dalam ekstrak dan fraksi faloak ditetapkan secara spektrofotometri visibel menggunakan pereaksi aluminium klorida (AlCl_3) seperti yang dilakukan oleh Ordonez *et al.* (2006) dengan modifikasi. Larutan sampel sebanyak 0,75 mL (ekstrak/fraksi 1% b/v dalam etanol kecuali fraksi tidak larut 0,4% b/v) atau larutan standar kuersetin sebanyak 750 μL dicampur dengan larutan AlCl_3 2% b/v dalam metanol. Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (hasil *operating time* 30-50 menit) kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 442 nm terhadap blangko reagen yang terdiri dari etanol dan AlCl_3 . Setiap sampel ditetapkan kadarnya sebanyak 3 kali replikasi. Kurva baku dibuat dengan menggunakan larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 6,25; 12,5; 25 dan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam etanol. Absorbansi sampel setelah dikurangi absorbansi blangko sampel (masing-masing larutan sampel tanpa penambahan AlCl_3) dihitung kadar flavonoid totalnya terhadap kurva baku kuersetin $y=0,0185x+0,0085$, $r=0,9999$. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekuivalen kuersetin tiap g sampel (mg EK/g sampel). Validasi metode analisis dilakukan terlebih dahulu menurut Harmita (2004) dan Fauziah *et al.* (2015).

Analisis statistik

Data kapasitas fagositosis, indeks fagositosis, dan kadar flavonoid total dianalisis menggunakan anova satu arah dan dilanjutkan uji Tukey HSD. Adanya korelasi antara kadar flavonoid total dan aktivitas fagositosis makrofag dianalisis menggunakan korelasi Pearson dan regresi. Analisis statistik tersebut menggunakan program komputer IBM SPSS versi 21. Nilai p lebih kecil dari 0,05 berarti terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik.

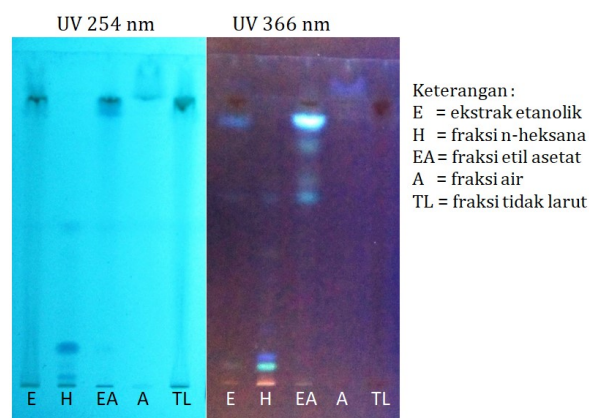
HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi ekstrak etanolik faloak dan profil KLT nya

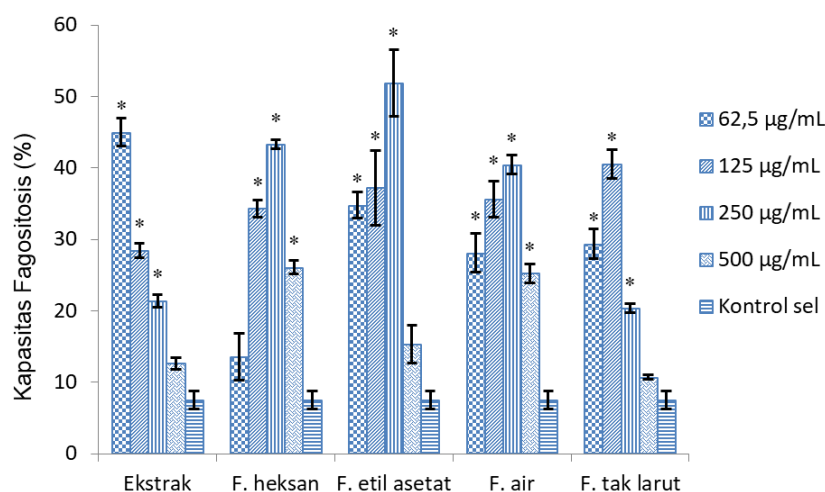
Hasil identifikasi tumbuhan faloak di Departemen Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM menunjukkan bahwa species tumbuhan faloak adalah *Sterculia quadrifida* R.Br. Sebanyak 2 kg serbuk kulit batang faloak dimaserasi menggunakan etanol 96% dan diperoleh ekstrak kental sebanyak 136,27 g (rendemen 6,81%). Rendemen ekstrak tersebut hampir sama dengan hasil peneliti terdahulu yaitu 7,88% (Siswadi, 2015). Hasil partisi cair-cair 20 gram ekstrak etanolik faloak diperoleh fraksi-fraksi mulai dari yang rendemennya terbesar ke yang terkecil berturut-turut adalah fraksi tidak larut (34,80%), fraksi air (27,01%), fraksi n-heksana (13,80%), dan fraksi etil asetat (9,50%).

Profil KLT ekstrak dan fraksi faloak menggunakan fase diam RP C-18 F_{254} S dan fase gerak air:aseton:asam formiat (5:20:1 v/v/v) serta dideteksi di bawah sinar UV_{254} dan UV_{366} menunjukkan bahwa profil KLT antar fraksi-fraksi faloak sudah berbeda (Gambar 1). Pada penelitian ini akan dicari fraksi yang paling tinggi dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

Ekstrak etanolik, fraksi n-heksana, dan fraksi etil asetat menunjukkan adanya bercak yang positif terhadap reagen anisaldehyd-asam sulfat yaitu bercak berwarna coklat dan ungu (data tidak ditampilkan), berarti kemungkinan terdapat senyawa steroid, terpenoid, dan fenolik (Wall, 2005). Pada ekstrak dan fraksi etil asetat terdapat bercak yang dengan anisaldehyd-asam sulfat berwarna ungu di sinar tampak dan berfluoresensi biru di sinar UV 366 nm, menurut Sutar *et al.* (2014) bercak tersebut merupakan senyawa flavonoid. Siswadi (2015) dan Winanta (2017) juga menyatakan bahwa kulit batang faloak mengandung senyawa flavonoid. Senyawa yang sudah diisolasi dari kulit batang tanaman genus *Sterculia* dan genus yang berkaitan erat antara lain : senyawa terpenoid : asam betulinat, lupenon, lupeol, asam oleanolat; senyawa steroid :



Gambar 1. Profil kromatogram ekstrak etanolik kulit batang faloak dan fraksi-fraksinya menggunakan fase diam RP C-18 F₂₅₄S dan fase gerak air:aseton:asam formiat (5:20:1 v/v/v) dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Profil kromatogram antar fraksi-fraksi faloak sudah berbeda.



Gambar 2. Profil kapasitas fagositosis makrofag akibat pemberian ekstrak etanolik kulit batang faloak dan fraksi-fraksinya. Hasil dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD (n=3). Nilai dengan tanda * menunjukkan perbedaan bermakna kelompok perlakuan dengan kontrol sel ($p < 0,05$). F = fraksi.

β -sitosterol, glukosida β -sitosterol, stigmasterol; senyawa fenolik : skopoletin, aquillokhin (kumarin); apigenin (flavon); kaemferol, glikosida kaemferol, kuersetin, glikosida kuersetin, isorhamnetin, glikosida isorhamnetin, kuersetin metil eter (flavonol); epikatekin, prosianidin B2 (flavanol) (Orisakeye and Olugbade, 2014; El-Sherei *et al.*, 2016).

Pengaruh ekstrak dan fraksi faloak terhadap aktivitas fagositosis makrofag *in vitro*

Fagositosis makrofag merupakan mekanisme pertahanan sel yang penting untuk melawan bahan asing dan telah digunakan sebagai parameter imunologis non-spesifik untuk mengevaluasi fungsi kekebalan tubuh (Galloway

and Depledge, 2001). Partikel lateks digunakan sebagai sistem untuk meniru interaksi inang dan patogen selama terjadinya penyakit menular sehingga penggunaan partikel lateks ini berdampak penting untuk memahami terjadinya fagositosis (Desjardins and Griffiths, 2003).

Tujuan uji aktivitas fagositosis makrofag adalah mengetahui efek penambahan ekstrak dan fraksi faloak dalam meningkatkan aktivitas sel makrofag memakan partikel lateks secara *in vitro*. Makrofag diisolasi dari cairan peritoneum mencit kemudian hasil uji diwarnai dengan cat Giemsa, makrofag akan berwarna keunguan sedangkan partikel lateks tidak akan terwarnai oleh cat Giemsa. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag ditandai dengan peningkatan jumlah

makrofag yang memfagositosis partikel lateks (kapasitas fagositosis) dan peningkatan jumlah partikel lateks yang difagositosis oleh makrofag (indeks fagositosis).

Ekstrak dan fraksi faloak dapat meningkatkan kapasitas fagositosis sel makrofag secara bermakna dibandingkan kontrol sel ($p < 0,05$) (Gambar 2). Kontrol pelarut yang digunakan yaitu dimetilsulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 % mempunyai kapasitas fagositosis yang sama dengan kontrol sel ($p > 0,05$). Namun kontrol positif yang digunakan yaitu sirup ekstrak echinaceae® dengan konsentrasi 100 dan 200 µg/mL mempunyai kapasitas fagositosis yang sama dengan kontrol sel ($p > 0,05$), hal ini karena belum tepatnya konsentrasi kontrol positif yang digunakan. Groom *et al.* (2007) melaporkan bahwa ekstrak echinaceae menstimulasi fagositosis makrofag secara *in vitro* pada konsentrasi 385 µg/mL, sedangkan Hartini *et al.* (2013) menggunakan kaplet® berisi ekstrak echinacea dan ekstrak buah elderberry hitam (*Sambucus nigra*) sebagai kontrol positif, pada konsentrasi sediaan 150 µg/mL (dihitung terhadap kandungan echinaceae) dapat meningkatkan kapasitas fagositosis makrofag dibandingkan dengan kontrol sel, hal ini karena selain echinaceae, fraksi karbohidrat dari ekstrak buah *Sambucus nigra* juga memiliki aktivitas menstimulasi makrofag (Barsett *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2015).

Konsentrasi ekstrak dan fraksi berpengaruh pada nilai kapasitas fagositosis (Gambar 2). Kapasitas fagositosis berbagai fraksi menunjukkan tren meningkat sampai maksimal kemudian menurun, terdapat konsentrasi optimum untuk menghasilkan kapasitas fagositosis yang maksimal. Hal yang berbeda terjadi pada ekstrak etanolik, yaitu kapasitas fagositosis ekstrak etanolik tertinggi dicapai pada konsentrasi ekstrak terkecil 62,5 µg/mL. Hal ini kemungkinan karena pada konsentrasi ekstrak yang tinggi terdapat senyawa yang bersifat menghambat fagositosis makrofag sedangkan pada konsentrasi ekstrak yang rendah efek penghambatan tersebut tidak muncul.

Guna mencari fraksi aktif dari ekstrak etanolik faloak, maka kapasitas fagositosis antar fraksi pada konsentrasi yang sama dibandingkan (Gambar 3). Kapasitas fagositosis makrofag tertinggi dicapai oleh fraksi etil asetat pada konsentrasi 250 µg/mL, yang berbeda bermakna ($p < 0,05$) dengan fraksi yang lain. Jadi dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi aktif dari ekstrak etanolik faloak.

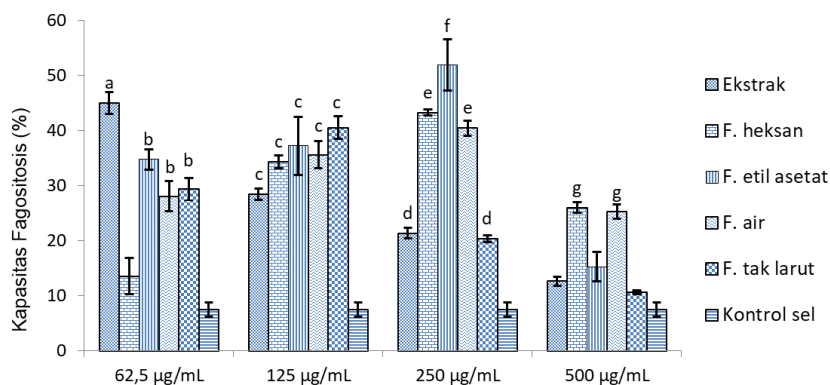
Parameter aktivitas fagositosis makrofag yang lain adalah indeks fagositosis. Hanya fraksi etil asetat pada konsentrasi 250 µg/mL yang dapat meningkatkan indeks fagositosis sel makrofag ($1,67 \pm 0,28$) secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol sel ($1,08 \pm 0,08$) sehingga dapat disimpulkan bahwa secara umum ekstrak etanolik faloak dan fraksi-fraksinya dapat menginduksi makrofag untuk memfagositosis lateks tetapi tidak dapat meningkatkan kemampuan makrofag untuk memfagositosis lateks lebih banyak.

Penetapan kadar flavonoid total dan korelasinya dengan aktivitas fagositosis makrofag

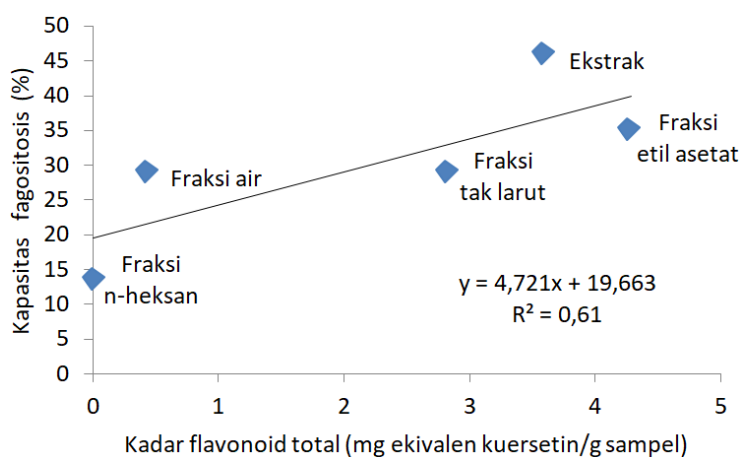
Flavonoid seperti kuersetin dan apigenin terbukti memiliki sifat imunoregulasi kuat pada berbagai model eksperimental (Durga *et al.*, 2014). Flavonoid dapat memodulasi makrofag yang terkait dengan inflamasi (Chirumbolo, 2010). Oleh karena itu kadar flavonoid total di dalam ekstrak dan fraksi faloak perlu ditetapkan untuk mengetahui korelasinya dengan aktivitas fagositosis makrofag.

Metode spektrofotometri berdasarkan pembentukan kompleks dengan $AlCl_3$ merupakan prosedur paling umum untuk menetapkan kadar flavonoid total di dalam sampel tanaman obat. Gugus hidroksi pada C3 dan C5 serta gugus dihidroksi pada cincin B flavonoid dapat membentuk kompleks khelat dengan $AlCl_3$ (Pekal and Pyrzyńska, 2014). Flavon dan flavonol dapat ditetapkan menggunakan reagen $AlCl_3$ (Chang *et al.*, 2002). Penelitian ini menggunakan reagen $AlCl_3$ tanpa penambahan kalium asetat (Ordonez *et al.*, 2006). Hasil penetapan panjang gelombang maksimal yaitu terdapat pergeseran batokromik kuersetin dari 373 nm menjadi 442 nm. Hasil ini sesuai dengan penelitian Denni dan Mammen (2012) yang menyatakan bahwa setelah penambahan reagen $AlCl_3$ tanpa penambahan kalium asetat terdapat pergeseran batokromik cincin B kuersetin dari 371 menjadi 445 nm.

Validasi metode harus dievaluasi terlebih dahulu karena sampel yang digunakan berbeda dengan Ordonez *et al.* (2006) dan terdapat modifikasi dalam metode analisis. Hasil validasi metode menunjukkan persamaan regresi hubungan antara absorbansi (y) dan konsentrasi flavonoid (x) sebagai $y = 0,0185x + 0,0085$, dengan koefisien korelasi $r^2 = 0,9999$, rentang linearitas 6,25-50 µg/mL, batas deteksi 1,97 µg/mL, batas kuantitasi 6,57 µg/mL, perolehan kembali 102,11%, dan simpangan baku relatif 0,012%. Hasil evaluasi tersebut menunjukkan bahwa metode analisis tersebut mempunyai



Gambar 3. Perbandingan kapasitas fagositosis makrofag pada pemberian ekstrak dan fraksi faloak pada konsentrasi yang sama. Hasil dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD ($n=3$). Nilai dengan huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan bermakna ($p<0,05$) dalam satu konsentrasi sampel yang sama. F = fraksi.



Gambar 4. Hubungan antara kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi kulit batang faloak dengan nilai kapasitas fagositosis makrofagnya.

ketepatan dan ketelitian yang tinggi sesuai dengan batas-batas unjuk kerja yang baik (Harmita, 2014 dan Rivai, 2010).

Kadar flavonoid total dinyatakan dengan mg ekivalen kuersetin tiap g sampel (mg EK/g sampel). Kadar flavonoid total dari yang tertinggi ke yang terendah berturut-turut adalah fraksi etil asetat ($4,290\pm 0,029$ mg EK/g), ekstrak etanolik ($3,600\pm 0,349$ mg EK/g), fraksi tidak larut ($2,838\pm 0,205$ mg EK/g), dan fraksi air ($0,422\pm 0,022$ mg EK/g) sedangkan kadar flavonoid total fraksi n-heksana tidak terdeteksi. Analisis anova satu jalan dilanjutkan uji Tukey HSD menunjukkan terdapat perbedaan bermakna kadar flavonoid total antar sampel tersebut ($p<0,05$). Kadar flavonoid total ekstrak etanolik faloak dalam penelitian ini ($3,60\pm 0,35$ mg EK/g sampel) hampir sama dengan penelitian Siswadi (2015) yang melaporkan kadar flavonoid total

ekstrak etanolik faloak sebesar $0,374\pm 0,093$ % b/b EK = $3,74\pm 0,93$ mg EK/g sampel.

Fraksi etil asetat mempunyai kadar flavonoid total yang paling tinggi diantara fraksi dan ekstrak, hal ini sejalan dengan aktivitas fagositosis makrofagnya. Analisis korelasi menunjukkan $p = 0,001 < 0,05$ berarti terdapat korelasi yang bermakna antara kadar flavonoid total di dalam ekstrak dan fraksi faloak dengan kapasitas fagositosis makrofagnya. Nilai korelasi Pearson sebesar 0,781 menunjukkan korelasi positif dengan kekuatan korelasi yang kuat (Dahlan, 2004), berarti semakin besar kadar flavonoid, maka semakin besar pula aktivitas fagositosis makrofagnya. Nilai kapasitas fagositosis yang digunakan pada analisis korelasi dan regresi adalah nilai kapasitas fagositosis pada konsentrasi sampel terkecil ($62,5$ µg/mL) karena pada konsentrasi tersebut *crude* ekstraknya

(ekstrak etanolik faloak) mempunyai kapasitas fagositosis terbesar.

Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa hubungan antara kadar flavonoid total (x) dengan kapasitas fagositosis (y) ekstrak dan fraksi faloak mempunyai koefisien korelasi (r^2)=0,61, ($y=4,721x+19,663$) (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan bahwa 61% aktivitas fagositosis makrofag merupakan hasil kontribusi dari flavonoid, sedangkan 39% yang lain berasal dari senyawa lain selain flavonoid (Rohman, 2007), seperti senyawa terpenoid. Lupeol (triterpen pentasiklik) yang diisolasi dari buah *Mangifera casturi* terbukti meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Sutomo *et al.*, 2013). Senyawa lupeol ini juga telah diisolasi dari kulit batang *Sterculia striata* (Costa *et al.*, 2010), tanaman yang satu genus dengan faloak (*Sterculia quadrifida*). Ranta (2011) menyatakan bahwa kulit batang faloak mengandung senyawa triterpenoid.

KESIMPULAN

Fraksi etil asetat merupakan fraksi aktif dari ekstrak etanolik kulit batang faloak sebagai imunomodulator secara *in vitro*. Fraksi etil asetat mempunyai kapasitas fagositosis makrofag dan kadar flavonoid total paling tinggi dibandingkan fraksi yang lain. Terdapat korelasi yang positif dan kuat antara kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi faloak dengan kapasitas fagositosis makrofagnya (koefisien korelasi Pearson 0,781) serta menunjukkan hubungan linier $y=4,721x+19,663$; $R^2 = 0,61$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Penunjang Disertasi tahun anggaran 2016.

DAFTAR PUSTAKA

Barsett, H., Aslaksen, T.H., Gildhyal, P., Michaelsen, T.E. & Paulsen, B.S., 2012, 'Comparison of carbohydrate structures and immunomodulating properties of extracts from berries and flowers of *Sambucus nigra* L.', *European Journal of Medicinal Plants* 2(3), 216-229.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C., 2002, 'Estimation of total flavonoid content in propolis by two complimentary colorimetric methods', *J. Food Drug Anal.* 10, 178-182.

Chirumbolo, S., 2010, 'The Role of quercetin, flavonols, and flavones in modulating

inflammatory cell function', *Inflammation & Allergy - Drug targets* 9(4), 263-285.

- Costa, D.A., Chaves, M.H., Silva, W.C.S. & Costa, C.L.S., 2010, 'Chemical constituents, total phenolics and antioxidant activity of *Sterculia striata* St. Hill. et Naudin', *Acta Amazonica* 40(1), 207-212.
- Dahlan, S., 2004, *Seri Statistik : Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan, Uji Hipotesis dengan Menggunakan SPSS Program 12 Jam*, PT Arkans, Jakarta, pp. 161-168.
- Denni, M. & Mammen, D., 2012, 'A critical evaluation on the reliability of two aluminium chloride chelation methods for quantification of flavonoids : Short communication', *Food Chem.* 135, 1365-1368.
- Desjardins, M. & Griffiths, G., 2003, 'Phagocytosis: latex leads the way', *Current Opinion in Cell Biology* 15, 498-503.
- Durga, M., Nathiya, S., & Devasena, T., 2014, 'Immunomodulatory and antioxidant actions of dietary flavonoids', *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 50-56.
- El-Sherei, M.M., Ragheb, A.Y., Kassem, M.E.S., Marzouk, M.M., Mosharrafa, S.A. & Saleh, N.A.M., 2016, 'Phytochemistry, biological activities and economical uses of the genus *Sterculia* and the related genera : A review', *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 6(6), 492-501.
- Fauziah, F., Rasyid, R. & Septiana, H., 2015, 'Penetapan kadar total α -mangostin dalam ekstrak etanol kulit batang asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb. Ex Choisy) dengan spektrofotometri ultraviolet', *Prosiding seminar nasional & workshop : perkembangan terkini sains farmasi & klinik 5*, Padang.
- Galloway, T.S. & Depledge, M.H., 2001, 'Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance', *Ecotoxicol.* 10(1), 5-23.
- Groom, S.N., Johns, T. & Oldfield, P.R., 2007, 'The potency of immunomodulatory herbs may be primarily dependent upon macrophage activation', *J. Med. Food* 10(1), 73-79.
- Harmita, 2004, 'Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya', *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3), 117-135.
- Hartini, Y.S., Wahyuono, S., Widayari, S. & Yuswanto, A., 2013, 'Uji aktivitas fagositosis makrofag fraksi-fraksi dari ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *in vitro*', *Jurnal Ilmu Kefarmasian* 11(2), 108-115.
- Ho, G.T.T., Ahmed, A., Zou, Y-F., Aslaksen, T., Wangensteen, H. & Barsett, H., 2015,

- 'Structure-activity relationship of immunomodulating pectins from elderberries', *Carbohydr. Polym.* 125, 314-322.
- Jensch-Junior, B.E., Pressinotti, L.N., Borges, J.C.S. & Cunha da Silva, J.R.M., 2006, 'Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)', *Aquaculture* 251, 509-515.
- Keong, Y.S., Alitheen, N.B., Mustafa, S., Aziz, S.A., Rahman, M.A. & Ali, A.M., 2010, 'Immunomodulatory effects of zerumbone isolated from roots of *Zingiber zerumbet*', *Pak. J. Pharm. Sci.* 23(1), 75-82.
- Mellawati, D., Sudarsono & Yuswanto, A., 2010, 'Pengaruh pemberian ekstrak zat pedas rimpang jahe emprit terhadap fagositosis makrofag pada mencit jantan yang diinfeksi dengan *Listeria monocytogenes*', *Majalah Obat Tradisional* 15(3), 112-120.
- Ordóñez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A. & Isla, M.I., 2006, 'Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts', *Food Chem.* 97, 452-458.
- Orisakeye, O.T. & Olugbade, T.A., 2014, 'Epicatechin and procyanidin B2 in the stem and root bark of *Sterculia tragacantha* Lindl (Sterculiaceae)', *Medicinal Chemistry* 4(2), 334-337.
- Pekal, A. & Pyrzynska, K., 2014, 'Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay', *Food Anal. Methods* 7, 1776-1782.
- Ranta, F., 2011, 'Sifat antimikroba zat ekstraktif pohon faloak (*Sterculia comosa* Wallich)', *Tesis*, Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Rivai, H., Nurdin, H., Suyani, H. & Bakhtiar, A., 2010, 'Pengaruh cara pengeringan terhadap perolehan ekstraktif, kadar senyawa fenolat dan aktivitas antioksidan dari daun dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC.)', *Majalah Obat Tradisional* 15(1), 26-33.
- Rohman, A., Riyanto, S. & Hidayati, N.K., 2007, 'Aktivitas antioksidan, kadar fenolik total, dan flavonoid total daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)', *Agritech.* 27(4), 147-151.
- Siswadi, 2015, 'Rendemen ekstrak dan flavonoid total kulit batang pohon faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) pada beberapa kelas diameter dan strata ketinggian tempat tumbuh', *Tesis*, Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada.
- Siswadi, Saragih, G.S. & Rianawati, H., 2013, 'Potential distributions and utilization of faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br. 1844) on Timor Island, East Nusa Tenggara', *Proceeding International Conference Forest and Biodiversity*, Manado Forestry Research Institute, Manado, pp. 165-171.
- Sutar, R.C., Kasture, S.B. & Kalaichelvan, V.K., 2014, 'Finger printing analysis of the flavonoids from *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) planch leaves using HPTLC analysis', *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(3), 80-85.
- Sutomo, Wahyuono, S., Rianto, S. & Setyowati, E.P., 2013, Isolation and identification of active compound of n-hexane fraction from kasturi (*Mangifera casturi* Konsterm.) against antioxidant and immunomodulatory activity', *Journal of Biological Sciences* 13(7), 596-604.
- Wall, P.E., 2005, *Thin-layer Chromatography : A Modern Practical Approach*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 146.
- Winanta, A., 2017, 'Uji aktivitas imunomodulator ekstrak kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) secara *in vitro* dan *in vivo*', *Tesis*, Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada.
- Yeap, S.K., Rahman, M.B.A., Alitheen, N.B., Ho, W.Y., Omar, A.R., & Beh, B.K. *et al.*, 2011, 'Evaluation of immunomodulatory effect: selection of the correct targets for immunostimulation study', *American Journal of Immunology* 7(2), 17-23.