



# Efek Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) terhadap Jumlah Limfosit dan Indeks Organ Limfoid Mencit Terinduksi CFA

Bernike Rose Sipayung<sup>1</sup>, Vinsa Cantya Prakasita<sup>1</sup>, Kukuh Madyaningrana<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta

\*Corresponding author: [madyaningrana@staff.ukdw.ac.id](mailto:madyaningrana@staff.ukdw.ac.id)

Diterima: November 2023 – Disetujui: November 2023 – Dipublikasi: November 2023

© 2023 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Halu Oleo Kendari

## Abstrak

Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) adalah tanaman yang berpotensi digunakan sebagai imunomodulator karena ragam kandungan fitokimia dan vitamin yang dimilikinya, terutama vitamin E. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi ekstrak daun Bayam Brasil dalam memodulasi jumlah limfosit, serta indeks organ limfoid pada mencit yang diinduksi *Complete Freund Adjuvant* (CFA). Daun Bayam Brasil diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Parameter yang diukur dari ekstrak daun Bayam Brasil meliputi skrining fitokimia, kadar flavonoid total dan vitamin E. Mencit Jantan dari galur Balb/C digunakan sebagai hewan coba untuk mempelajari pengaruh pemberian ekstrak daun Bayam Brasil pada jumlah limfosit, serta indeks nilai organ timus dan limpa. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari, kemudian diinduksi CFA melalui subkutan, dan diberi perlakuan oral selama 7 hari berdasarkan kelompok uji KS (kontrol sehat), KN (kontrol negatif), KP (vitamin E 200 IU), EEBC (ekstrak Bayam Brasil dengan variasi dosis 209,25 mg/g BB, 418,4 mg/g BB, dan 627,72 mg/g BB). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak daun Bayam Brasil mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, dan tanin, serta mengandung kadar flavonoid total 86,25 mg QE/g dan vitamin E 375,5 mg/100 g. Uji *in vivo* menunjukkan pengaruh ekstrak daun Bayam Brasil terhadap modulasi limfosit serta indeks organ limfoid mencit. Dosis ekstrak sebesar 627,72 mg/g BB merupakan dosis terbaik dalam memberikan efek imunomodulasi berupa penurunan jumlah limfosit mencit yang diinduksi dengan CFA

**Kata kunci:** Bayam Brasil, ekstrak daun, limfosit, organ limfoid, mencit

## Abstract

Brazilian spinach (*Alternanthera sissoo hort*) is a potential plant to be used as an immunomodulator because of its various content of phytochemicals and vitamins, especially vitamin E. This study aimed to determine the potential of Brazilian spinach leaf extract in modulating the number of lymphocytes, as well as lymphoid organ index in mice induced with Complete Freund Adjuvant (CFA). Brazilian spinach leaves were extracted by maceration method in ethanol solvent. Parameters measured from its leaves extract included phytochemical groups, total flavonoid levels and vitamin E. Balb/C male mice were employed as experimental animals to test the effect of Brazilian Spinach leaves extract to mice lymphocytes count, and thymus and spleen index. Mice were acclimatized for 7 days, then induced with CFA via subcutaneous, and given oral treatment for 7 days based on the test group, namely KS (healthy control), KN (negative control), KP (vitamin E 200 IU), and EEBC (spinach leaves extract with doses of 209.25 mg/g BW, 418.4 mg/g BW and 627.72 mg/g BW). The results showed that Brazilian spinach extract contained flavonoids, alkaloids, saponins, steroids, and tannins. Its total flavonoid content was 86.25 mg QE/g and its vitamin E level was 375.5 mg/100 g. In vivo tests showed leaves extract modulating effect on lymphocyte counts and thymus and spleen index. Dose of 627.72 mg/g BW was the best one in providing immunomodulatory effects in the form of lymphocytes number decrease in CFA-induced mice

**Keywords:** Brazilian spinach, leaves extract, lymphocytes, organ limfoid, mice.

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang masuk dan berkembang biak di tubuh manusia sehingga kualitas kesehatan menurun. Sistem imun akan melakukan perlawanan dan membunuh patogen melalui respon imun, dengan terjadi reaksi inflamasi terkoordinasi yang melibatkan komponen sel dan non sel imun (Steinman, 2012). Ketidakmampuan sel imun yang terlibat untuk mengeliminasi agen infeksi dapat berdampak pada rekrutmen dan aktivasi limfosit yang menginduksi inflamasi berkelanjutan dan diferensiasi sel inflamasi. Hal ini berkontribusi untuk melanggengkan proses inflamasi dengan meningkatnya produksi kadar sitokin pro-inflamasi yang berakibat adanya respon sel T yang tidak efisien (Steinman, 2012). Respon sel imun yang tidak optimal bisa dibantu dengan konsumsi senyawa imunomodulator yang berfungsi membantu menyeimbangkan kerja sistem imun melalui modulasi kinerja sistem imun tubuh baik dengan cara meningkatkan atau menurunkan respon sistem imun (Block & Mead, 2003).

Salah satu pendekatan yang saat ini banyak dilakukan dalam bidang medis adalah pemanfaatan senyawa biofarmaka dari bahan alam sebagai komponen obat. Potensi bahan alam dalam bidang medis ini didasarkan pada kandungan fitokimia dengan berbagai efek farmakologis. Pemanfaatan obat berbasis tanaman juga menyoasar pada terapi

imunomodulasi. Imunodulator berbasis bahan herbal akan mengubah aktivitas fungsi sistem imun melalui regulasi dinamis yang dapat

memodulasi dan menstimulasi komponen sel imun, antibodi dan sitokin (Spelman et al., 2006).

Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) merupakan tanaman introduksi dari benua Amerika Selatan yang dapat tumbuh dengan baik di Indonesia. Bayam Brasil mengandung kelompok fitokimia flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan steroid (Wuni et al, 2022). Ekstrak daun Bayam Brasil juga mengandung vitamin E yang berperan sebagai imunomodulator alami (Wuni et al., 2022; Limeranto, 2022). Vitamin E berperan sebagai antioksidan yang melindungi sel-sel dari kerusakan akibat stres oksidatif akibat adanya infeksi oleh patogen, sehingga meningkatkan proliferasi sel dan integritas membran sel imun (Traber & Atkinson, 2007). Hasil penelitian Wuni et al. (2022) menunjukkan bahwa efek imunomodulasi daun Bayam Brasil terlihat dari peningkatan jumlah limfosit mencit yang diberi perlakuan ekstrak daun Bayam Brasil. Penelitian tersebut tidak didahului dengan pemberian agen infeksi untuk menginduksi respon inflamasi, sehingga sebagai lanjutan dari penelitian tersebut dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mempelajari potensi ekstrak daun Bayam Brasil dalam memodulasi jumlah limfosit, serta indeks organ timus pada mencit yang diinduksi *Complete Freund Adjuvant* (CFA).

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan tempat

Daun bayam Brasil yang digunakan dalam penelitian ini dikoleksi dari Kebun Omah Paseduluran di Pandowoharjo, Sleman, D.I. Yogyakarta dan Kebun Gemah Ripah Bausasran, Yogyakarta, D.I. Yogyakarta. Bayam Brasil yang

daunnya diambil dari dua lokasi yang berbeda tersebut mempunyai indukan dari tempat pembibitan yang sama.

### **Pembuatan Ekstrak**

Sebanyak 600 g serbuk simplisia daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissou hort*) dilarutkan dalam 2L etanol 96%, diaduk sampai homogen dan diinkubasi dalam ruangan kedap cahaya selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas menggunakan kain mori. Ampas simplisia diremaserasi lanjut dengan pelarut etanol 96% selama 2 x 24 jam. Total durasi maserasi selama 3 x 24 jam bertujuan agar senyawa fitokimia yang masih tersisa dari maserasi pertama dapat seluruhnya terekstraksi Ekstrak kental kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dikurangi kadar airnya menggunakan oven pada suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak berbentuk pasta (Anonim, 2000). Nilai rendemen ekstrak dihitung dengan formula (Whika *et al.*, 2007):

$$\text{Rendemen} : \frac{\text{Bobot ekstrak (Akhir)}}{\text{Bobot ekstrak (Awal)}} \times 100\%$$

### **Uji Biokimia Kualitatif untuk Deteksi Fitokimia**

#### **Uji Flavonoid**

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan dalam 4 ml akuades, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 yaitu A dan B. Larutan A ditambahkan 3 tetes HCL pekat dan 0,1 g Mg bubuk, kemudian dihomogenkan pelan. Hasil positif ditandai adanya perubahan warna merah jingga. Larutan B dijadikan sebagai blanko (Harbone, 1987).

#### **Uji Alkaloid**

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan dalam 6 ml akuades,

kemudian disaring. Filtrat dibagi 3, yaitu A,B dan C. Larutan A ditetesi dengan reagen weagener, larutan B difungsikan sebagai blanko dan larutan C ditetesi dengan reagen mayer. Hasil positif ditandai dengan adanya edapan (Harbone, 1987).

#### **Uji Tanin**

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan dalam 10 ml akuades panas, kemudian didinginkan. Larutan ditambahkan 5 tetes NaCl 10%, dihomogenkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 yaitu A dan B. Larutan A ditambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%, sedangkan larutan B dijadikan sebagai blanko. Hasil positif berwarna biru kehitaman atau hijau kehitaman yang menandakan adanya senyawa tanin (Harborne, 1987).

#### **Uji Saponin**

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan dalam 5 ml akuades panas, kemudian dikocok kuat hingga muncul buih setinggi 1-10 cm yang menandakan adanya saponin (Harborne, 1987).

#### **Uji Steroid dan Terpenoid**

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan dalam 15 mL etanol 96% kemudian dibagi menjadi 3 yaitu A, dan B. Larutan A ditambahkan 3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, kemudian digojog pelan. Hasil positif terbentuknya warna hijau biru yang menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan warna merah keunguan adanya senyawa terpenoid. Larutan B dijadikan sebagai blanko (Harborne, 1987).

### **Analisis Kuantitatif Kandungan Flavonoid**

### **Pembuatan Kurva Standar Quercetin**

Sebanyak 20 mg *quercetin* ditimbang untuk larutan stok dan dilarutkan dalam 20 mL etanol 96%. Larutan stok diambil sebanyak 5 mL dan ditambahkan etanol 96% hingga mencapai volume 50 mL pada labu ukur untuk konsentrasi 100 ppm. Dari 100 ppm larutan standar *quercetin*, dibuat konsentrasi 2 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan standar *quercetin* diambil sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan  $\text{AlCl}_3$  2% sebanyak 1 ml, dan  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  0,12 M sebanyak 1 ml. Larutan diinkubasi kemudian 60 menit dan dihitung nilai absorbansi di spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 435 nm (Aminah *et al.*, 2017).

### **Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)**

Ekstrak etanol Bayam Brasil (EEBB) ditimbang sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Sebanyak 1 ml sampel EEBB ditambahkan  $\text{AlCl}_3$  2% sebanyak 1 ml, dan  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  0,12 M sebanyak 1 ml, kemudian selama 60 menit diinkubasi dan dihitung nilai absorbansi di spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 435 nm. Sampel dibuat dalam tiga pengulangan dan dianalisis sehingga diperoleh rata-rata nilai absorbansi (Aminah *et al.*, 2017). Rumus perhitungan kadar flavonoid total sebagai berikut (Chotimah, 2019):

$$F = \frac{c \times v}{m}$$

dengan F = kadar flavonoid total (mg QE/g), c = konsentrasi flavonoid (mg/L), v = volume (L)

dan m = massa EEBB (ekstrak etanol Bayam Brasil).

### **Analisis Kadar Vitamin E Ekstrak Etanol Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*)**

Analisis kadar vitamin E ekstrak etanol daun Bayam Brasil (EEBB) dilakukan dengan pengiriman sampel ekstrak daun bayam Brasil ke Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sampel ekstrak yang dikirim dikemas dalam botol sampel yang tertutup rapat dengan bagian luar tutup botol sampel dilapisi *plastic wrap*, dan keseluruhan badan botol dilapisi *aluminium foil* untuk menjaga kondisi ekstrak daun bayam Brasil.. Botol sampel diberi label EEBB. Analisis kadar vitamin E ini dilakukan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

### **Persiapan dan Perlakuan Hewan Coba**

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus L.*) BALB/c jantan dengan berat badan 20-30 g dan umur 2-3 bulan. Mencit diperoleh dari Peternakan Hewan Uji Abadi Jaya, Sleman, D.I. Yogyakarta. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Kandang mencit dibersihkan rutin untuk menciptakan ruang hidup yang bersih dan sehat. Penggunaan mencit dalam uji *in vivo* memperhatikan prinsip *animal welfare* berdasarkan izin *Ethical Clearance* dengan Etik Nomor: 1530/C.16/FK/2023 dari Komisi Etik FK UKDW. Mencit yang digunakan sebanyak 24 ekor yang terbagi dalam 6 kelompok uji sebagai berikut : kontrol sehat (KS) tanpa perlakuan, kontrol negatif (KN) yang diinduksi 0,1 mL CFA dan diberi 0,5 ml

akuades steril per oral, kontrol positif (KP) yang diinduksi 0,1 mL CFA dan diberi vitamin E 200 IU (1,67 mg/g BB) per oral, perlakuan EEBB1 yang diinduksi 0,1 mL CFA dan diberi 209,25 mg/g BB ekstrak Bayam Brasil per oral, perlakuan EEBB2 yang diinduksi 0,1 mL CFA dan diberi 418,5 mg/g BB ekstrak Bayam Brasil per oral dan perlakuan EEBB3 yang diinduksi 0,1 mL CFA dan diberi 627,75 mg/g BB ekstrak Bayam Brasil per oral. Induksi Complete Freund Adjuvant dilakukan dengan injeksi subkutan dan dilakukan satu kali sebelum perlakuan dengan vitamin E dan ekstrak etanol bayam Brasil (EEBB). Pemberian ekstrak etanol bayam Brasil dilakukan per oral dengan frekuensi 1 kali sehari selama durasi 7 hari penelitian.

Perhitungan konversi dosis ekstrak Bayam Brasil ke mencit dilakukan dengan memperhatikan kadar vitamin E yang terdapat dalam EEBB untuk selanjutnya dihitung perhitungan berdasarkan formula Liu dan Fan (2017) :

$$\frac{A \text{ (hewan)}}{B \text{ (manusia)}} = \frac{KmB}{Km A}$$

### Penghitungan Nilai Relatif Limfosit

Sampel darah mencit diambil dari pembuluh darah yang dekat dengan mata (sinus orbitalis) menggunakan bantuan jarum. Sebanyak 0,2 ml sampel darah yang terambil kemudian ditampung pada mikrotube. Sebelum terkoagulasi, 5  $\mu$ L sampel darah diteteskan pada gelas benda untuk pembuatan preparat apus darah. Setelah darah kering angin, dilakukan fiksasi dengan metanol selama 5 menit dan diwarnai dengan larutan giemsa selama 30 menit. Gelas benda

kemudian dibilas dengan akuades dan dikeringanginkan. Jenis leukosit yang dihitung adalah limfosit sebagai perwakilan dari sel imun. Penghitungan leukosit dilakukan dengan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Sampel darah yang dihitung adalah sampel darah mencit hari ke-0, hari ke-3 dan hari ke-7 perlakuan. Jumlah leukosit dihitung menurut formula Aldi *et al.*, (2016) sebagai berikut.

$$\text{Jumlah Sel: } \frac{\text{Jumlah Jenis Sel}}{100 \text{ sel leukosit}} \times 100\%$$

### Penghitungan Nilai Indeks Organ Limfoid

Organ limfoid berupa timus dan limpa mencit diambil di hari ke-7 saat mencit dieuthanasia. Berat organ limfoid ditimbang untuk menghitung indeks organ dengan formula Aldi *et al.*, (2016) sebagai berikut:

Indeks organ:

$$\frac{\text{berat organ (g)}}{\text{berat badan akhir (g)}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstrak Etanol Bayam Brasil

Daun Bayam Brasil diekstrak dengan metode maserasi yaitu merendam bubuk simplisia dengan pelarut organik pada suhu ruang sehingga proses ekstraksi tidak pada suhu tinggi yang dapat mencegah terurainya fitokimia yang terkandung. Selama proses perendaman terjadi ketidakseimbangan tekanan osmosis didalam dan diluar sel sehingga dinding sel lisis dan fitokimia dapat ikut terlarut (Wendersteyt *et al.*, 2021). Dalam penelitian ini, etanol 96% dipilih sebagai pelarut karena etanol merupakan

pelarut organik yang bersifat polar dan *universal* sehingga lebih mudah larut dan masuk ke dalam dinding sel daun Bayam Brasil dan dapat melarutkan fitokimia yang terkandung dalam sel. Pelarut etanol juga bersifat antimikroba dan tidak toksik.

Proses ekstraksi menghasilkan 84 g ekstrak dengan tekstur pasta berwarna hijau pekat dengan nilai rendemen 14%. Hasil penelitian Wuni *et al* (2022) yang mengekstraksi 1 kg sampel daun bayam dengan pelarut etanol 96% selama 5 hari menunjukkan dihasilkannya nilai rendemen sebesar 12,3%. Perbandingan ini menunjukkan bahwa nilai rendemen ekstrak daun Bayam Brasil yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode remaserasi akan jauh lebih tinggi dibanding dengan maserasi. Hal ini dikarenakan dalam proses remaserasi terdapat adanya penggantian etanol 96% berulang sehingga tingginya ketidakseimbangan tekanan osmosis dapat menyebabkan sel lisis secara berkala dan meningkatkan akumulasi fitokimia yang terkandung dalam sitoplasma Bayam Brasil larut.

### Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Bayam Brasil

Hasil uji biokimia kualitatif ekstrak etanol daun Bayam Brasil berhasil mengidentifikasi keberadaan kelompok senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, fenolik, saponin, terpenoid dan steroid (Tabel 1). Kelompok fitokimia yang terdeteksi ini mempunyai kesesuaian dengan deteksi yang dilakukan oleh Wuni *et al* (2022) karena kesamaan sampel organ dan jenis pelarut yang digunakan.

**Tabel 1.** Hasil *screening* fitokimia ekstrak etanol Bayam Brasil

| Jenis Fitokimia  | Hasil |
|------------------|-------|
| Flavonoid        | +     |
| Alkaloid Weagner | +     |
| Alkaloid Meyer   | +     |
| Saponin          | +     |
| Tanin            | +     |
| Steroid          | +     |
| Terpenoid        | -     |

Keterangan : (+) adanya fitokimia terdeteksi. (-) Tidak adanya fitokimia terdeteksi

Ragam senyawa flavonoid diketahui memiliki aktivitas biologis sebagai anti tumor, antibakteri, antioksidan, antiinflamasi dan imunomodulator. Alkaloid dapat berfungsi sebagai imunomodulator yang mengatur proliferasi limfosit di timus dan limpa serta sekresi sitokin (Jiang *et al.*, 2021). Saponin memiliki efek imunostimulan melalui interaksinya dengan *Antigen Presenting Cell* (APC) yang mengaktifkan pensinyalan intraseluler dan meningkatkan pelepasan sitokin (Sulasimi *et al.*, 2018). Steroid berperan sebagai antiinflamasi dengan sifat immunosupresif yang merusak aktivasi limfosit T dengan menghalangi sel TH<sub>1</sub> dan mengaktifasi sel TH<sub>2</sub> dan TH<sub>3</sub>, melalui perekrutan sel T regulator dan polarisasi makrofag M2 yang mempengaruhi inflamasi. Pemberian steroid jangka panjang dapat menimbulkan berbagai efek samping karena keseimbangan sistem imun terganggu akibat immunosupresan (Della & Morgillo, 2019).

### Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Bayam Brasil

Hasil skrining fitokimia dengan uji biokimia kualitatif menunjukkan keberadaan kelompok flavonoid. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik alami yang ditemukan dalam bentuk glikosida pada buah-

buah, dan sayuran. Aktivitas antioksidan dari flavonoid ini mendukung kontrol radikal yang berlebihan yang disebabkan oleh proses inflamasi yang terkait dengan berbagai gangguan neurodegeneratif dan imunologis (Lluis & Morales, 2008; Lan *et al.*, 2013). Aktivitas flavonoid dalam respon inflamasi meliputi penghambatan mediator inflamasi seperti *reactive oxygen species* (ROS) dan *nitric oxide* (NO); pengaturan aktivitas enzim inflamasi, seperti siklooksigenase (COXs) dan nitric oxide synthase (iNOS) yang dapat diinduksi; penurunan tingkat produksi dan ekspresi sitokin dan modulasi faktor transkripsi (Ribeiro *et al.*, 2015). Analisis kadar flavonoid total yang terkandung dalam ekstrak etanol daun Bayam Brasil menggunakan spektrofotometer UV-Vis

dengan larutan standar *quercetin*. *Quercetin* dan glikosidanya berada dalam jumlah 60-70% dari flavonoid dan banyak terdapat dalam tanaman sehingga banyak dijadikan sebagai senyawa standar untuk mendeteksi flavonoid total (Kumar & Pandey, 2013). *Quercetin* adalah flavonoid golongan flavonol sehingga mempunyai gugus keto pada C-4 dan gugus hidroksi pada C-3 atau C-5 yang dapat bereaksi dengan  $AlCl_3$  membentuk kompleks warna. Penentuan kurva standar *quercetin* dengan membuat konsentrasi seri *quercetin* yaitu 2 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm yang dihitung absorbansinya pada panjang gelombang 435 nm (Aminah *et al.*, 2017). Hasil penghitungan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun Bayam Brasil disajikan dalam Tabel 2

**Tabel 2.** Hasil penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun Bayam Brasil

| Berat ekstrak (g) | Absorbansi (A)          | Absorbansi rata-rata (A) | Konsentrasi ekstrak etanol daun Bayam Brasil (mg/L) | Kadar Flavonoid Total (mg QE/g EBB) |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------------------------------|
| 0,01              | 0,214<br>0,249<br>0,258 | 0,240                    | 8,625   | 86,25                               |

### Kadar Vitamin E dalam Ekstrak Etanol Bayam Brasil

Hasil analisis vitamin E yang dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Bayam Brasil mengandung vitamin E sebanyak 375,5 mg/100g (Tabel 3.). Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Limeranto (2022) yang menyatakan bahwa kadar vitamin E daun Bayam Brasil adalah sebanyak 70,92 mg/100 g. Akan tetapi, penelitian

Limeranto tersebut menggunakan sampel berupa daun Bayam Brasil segar yang diblender dan ditambahkan dengan air, sehingga kemungkinan vitamin E yang terdeteksi lebih rendah. Alasan ini didasarkan pada sifat vitamin E yang sukar larut dalam air, namun larut dalam senyawa organik seperti alkohol, lemak, dan minyak (Casas, 2007). Penelitian ini menggunakan etanol 96% sebagai pelarut yang tergolong dalam alkohol sehingga kandungan vitamin E lebih banyak terdeteksi.

**Tabel 3.** Kadar Vitamin E dalam ekstrak etanol daun Bayam Brasil

| Pengulangan | Vitamin E (mg/100g) | Rata – rata vitamin E (mg/100g) |
|-------------|---------------------|---------------------------------|
| 1           | 381,1               | 375,5                           |
| 2           | 369,9               |                                 |

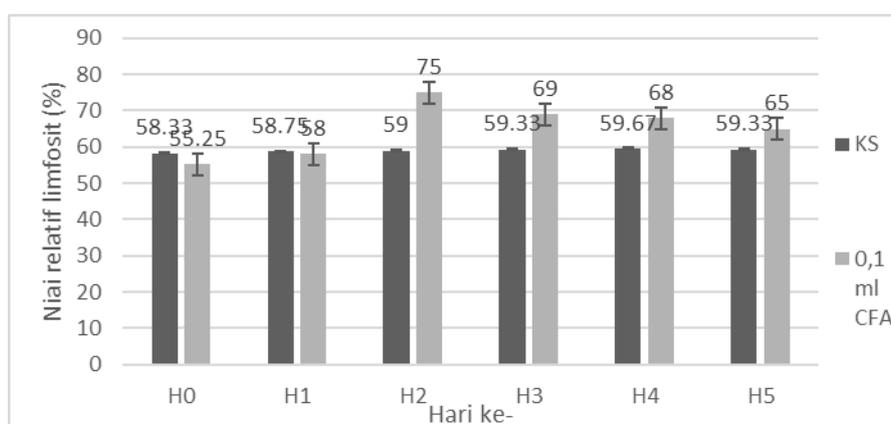
### Efek Induksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) terhadap Jumlah Limfosit Mencit

Uji pendahuluan dengan induktor inflamasi yang dilakukan dengan injeksi *Complete Freund Adjuvant* (CFA) dilakukan untuk mendapatkan gambaran waktu pemberian perlakuan (kontrol sehat, kontrol negatif, kontrol positif, dan ekstrak etanol daun Bayam Brasil) dengan melihat hari terdapatnya jumlah limfosit tertinggi.

Pemilihan CFA yang berbahan utama suspensi *Mycobacterium tuberculosis* yang dilemahkan mempunyai asumsi dasar bahwa CFA lebih cepat menginduksi respon inflamasi yang ditandai terbentuknya edema disekitar tempat injeksi. Hal ini juga disebabkan karena patogen dari CFA bersifat sangat asing bagi tubuh mencit, sehingga sesuai penelitian Suhirman & Winarti (2010) yang mengatakan bahwa semakin asing antigen yang menyerang tubuh maka akan semakin efektif menstimulasi respon sistem imun.

Abbas et al. (2016) menyatakan bahwa limfosit dari sistem imun adaptif memiliki mekanisme spesifik terhadap antigen. Pada tahapan respon imun, *Antigen Presenting Cell* (APC) akan memberikan sinyal berupa fraksi patogen kepada limfosit T helper untuk menginduksi proliferasi limfosit naif. Hasil induksi ini akan mengakibatkan aktivasi limfosit B dan T dalam melawan patogen yang telah masuk ke dalam tubuh.

Hasil uji pendahuluan dengan injeksi CFA (Gambar 1) menunjukkan bahwa nilai relatif (NR) limfosit mencit kelompok kontrol sehat (KS) yang tidak diinduksi CFA lebih rendah dibandingkan NR limfosit kelompok mencit yang diinduksi 0,1 ml CFA. Hal ini mengindikasikan bahwa CFA mampu merangsang proliferasi dan diferensiasi limfosit untuk memulai respon imun berupa baik berupa aktivasi sel sitotoksik dan penghasilan antibodi sebagai respon terhadap antigen CFA.



**Gambar 1.** Nilai relatif limfosit (%) mencit yang diinduksi CFA melalui injeksi subkutan selama 5 hari.

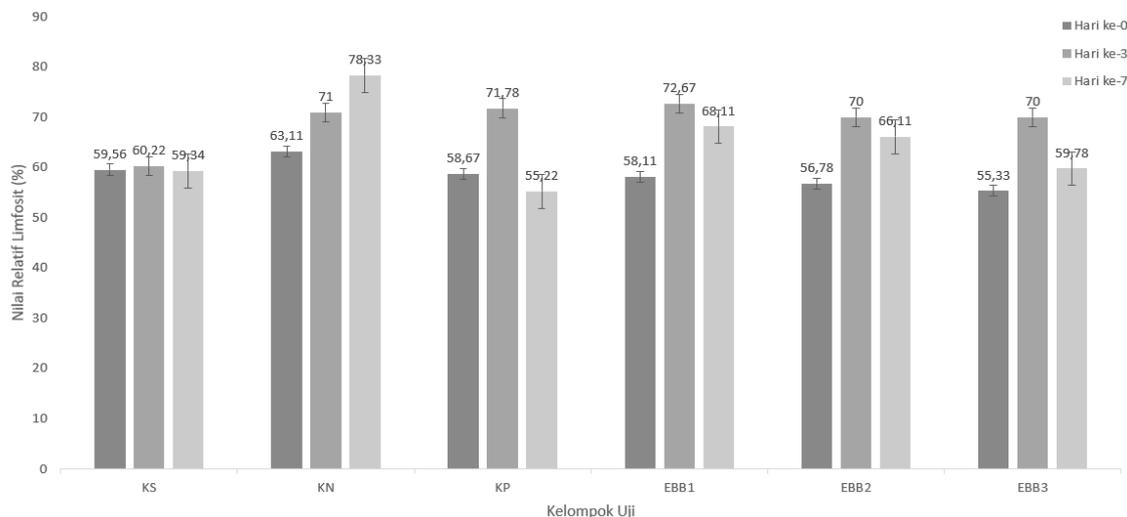
Peningkatan NR limfosit tertinggi pada mencit yang diinduksi 0,1 ml CFA terdapat pada hari ke-2, yaitu sebesar 25% dibandingkan pada hari ke-0 sebelum diinduksi yang mempunyai nilai 55,25%. Jika dibandingkan dengan KS, NR limfosit pada hari ke-2 juga berbeda jauh yaitu sebesar 59%. Peningkatan NR limfosit pada hari ke-2 ini dijadikan sebagai acuan untuk dimulainya pemberian perlakuan (kontrol sehat, kontrol negatif, kontrol positif, dan EEBB).

**Efek Pemberian Ekstrak Etanol Daun Bayam Brasil Terhadap Nilai Relatif Limfosit Mencit Jantan yang Diinduksi *Complete Freund Adjuvant***

Limfosit adalah salah satu jenis sel leukosit yang berperan sebagai sel imun utama imunitas adaptif. Limfosit diproduksi di sumsum tulang dan mengalami pendewasan di organ limfoid seperti timus dan limpa. Limfosit berbentuk bulat atau oval dengan diameter 7-8 mm dan berukuran lebih kecil dari eritrosit, dengan nukleus yang menempati sebagian besar struktur sel. Dua jenis utama limfosit adalah limfosit B dan limfosit T. Limfosit B memproduksi antibodi terhadap antigen asing, sedangkan limfosit T menghancurkan sel yang terinfeksi oleh patogen dan sel abnormal lainnya. (Gonzales & Cordoba, 2012; Septianto *et al.*, 2015).

Hasil penghitungan jumlah limfosit dari preparat apus darah mencit dari berbagai perlakuan dalam penelitian ini (Gambar 2) menunjukkan bahwa pengaruh beragam perlakuan terhadap presentase nilai limfosit menghasilkan nilai peningkatan dan penurunan yang berbeda. Nilai relatif (NR) limfosit pada semua kelompok perlakuan di hari ke 0 memiliki range 55,33 – 59,56%. Nilai ini sebanding dengan presentase jumlah limfosit normal pada mencit yaitu 55-95% (Septianto *et al.*, 2015).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi inflamasi dengan CFA meningkatkan jumlah limfosit yang dapat dilihat pada hari ke 3, kecuali pada kelompok KS yang tidak diberikan induksi CFA. Pemberian antigen berupa CFA ini menaikkan respon imun mencit melalui kenaikan jumlah limfosit yang terhitung pada preparat apus darah. Jumlah limfosit ini terlihat turun pada hari ke-7 (hari terakhir pemberian perlakuan) pada kelompok mencit yang diberi vitamin E 200 IU (kontrol positif), dan kelompok mencit yang diberi perlakuan tiga dosis ekstrak daun Bayam Brasil (209,25 mg/g BB, 418,5 mg/g BB dan 627,72 mg/g BB). Data tersebut mengindikasikan kemampuan ekstrak daun Bayam Brasil dalam menurunkan jumlah limfosit mencit yang sempat naik sebagai respon pemberian antigen dalam bentuk CFA.



**Gambar 2.** Nilai relatif limfosit mencit yang diberi perlakuan per oral ekstrak daun Bayam Brasil selama 7 hari. Keterangan : KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBB1 (perlakuan EEBB dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBB2 (perlakuan EEBB dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBB3 (perlakuan EEBB dosis 3 = 627,72 mg/g BB).

Hasil analisis statistic post hoc terhadap nilai relatif (NR) limfosit yang ditunjukkan pada Gambar 2 menunjukkan bahwa NR limfosit yang dihasilkan perlakuan vitamin E dan dosis 3 ekstrak daun Bayam Brasil berada pada subset yang sama (Tabel

4). Hal tersebut mengindikasikan bahwa kedua perlakuan mempunyai potensi yang sama dalam menurunkan jumlah limfosit mencit yang sebelumnya telah mengalami kenaikan jumlah selnya akibat induksi dengan CFA.

**Tabel 4.** Analisis *post hoc* test nilai relatif limfosit

| Kelompok Uji | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |
|--------------|---|-------------------------|---------|---------|
|              |   | 1                       | 2       | 3       |
| KP           | 3 | 58,2233                 |         |         |
| EBB3         | 3 | 59,7767                 |         |         |
| KS           | 3 | 60,3367                 |         |         |
| EBB2         | 3 |                         | 65,4433 |         |
| EBB1         | 3 |                         | 68,1100 |         |
| KN           | 3 |                         |         | 78,3333 |

Efek imunomodulasi ekstrak daun Bayam Brasil terhadap penurunan jumlah limfosit mencit yang diinduksi CFA diduga kuat terkait dengan

kandungan vitamin E dan senyawa flavonoid yang dimilikinya. Vitamin E

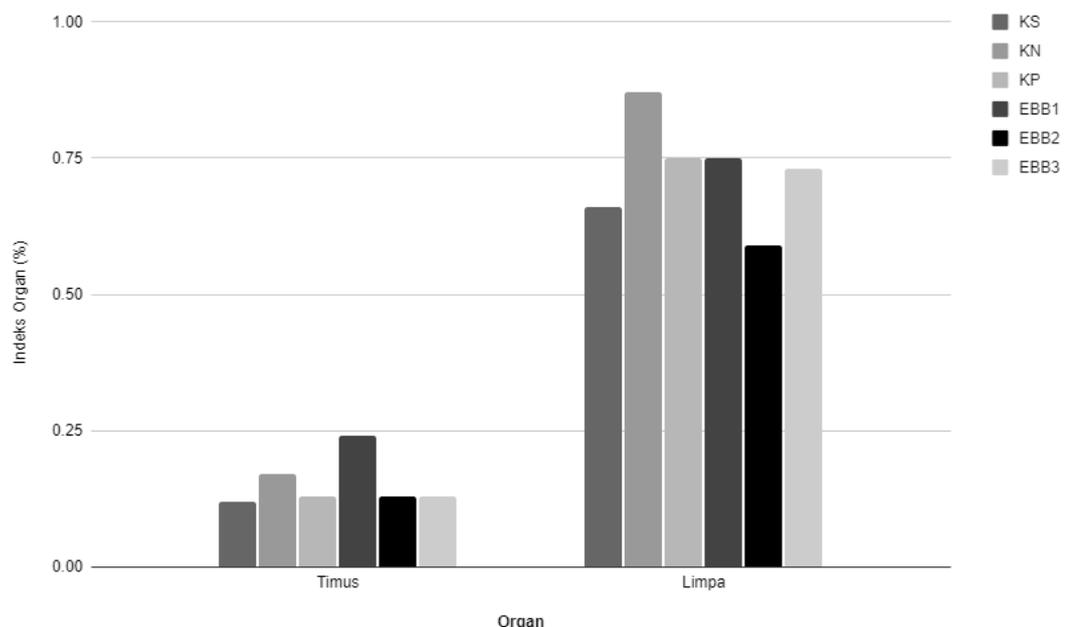
memiliki efek imunomodulator pada sel imunitas bawaan dan adaptif. Vitamin E mampu meningkatkan produksi sel T, meningkatkan aktivasi sel NK, meningkatkan sekresi sitokin IL-2 dan meningkatkan respon limfosit sehingga memfasilitasi respon imun terhadap antigen dan menurunkan risiko penyakit

infeksi (Grebenstein *et al.*, 2017; Traber, 2007; Traber & Atkison, 2007). Polak *et al.* (2021) serupa menyatakan efek pemberian vitamin E pada hewan pengerat menyebabkan penurunan konsentrasi IL-1 $\beta$ , dan peningkatan kadar IL-2 dengan efek imunomodulator. Keberadaan flavonoid dalam ekstrak etanol daun Bayam Brasil dapat bertindak sebagai anti-inflamasi yang memblokir pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisozim, kemudian menghambat fase proliferasi dan eksudatif sel inflamasi (Rinidar *et al.*, 2018), sehingga adanya pengaturan enzim inflamasi seperti siklooksigenase dan lipooksigenase yang dapat menekan peningkatan limfosit (Aria *et al.*, 2020).

#### Indeks Organ Limfoid

Perhitungan nilai indeks organ merupakan salah satu parameter untuk mengetahui perlakuan dosis yang

diberikan dapat menyebabkan efek yang merugikan terhadap hewan coba yaitu melalui pembesaran atau penyusutan organ (Prananda, 2018). Nilai indeks organ belum dijadikan standar utuh dalam penentuan kerusakan atau perbaikan terhadap fungsi organ karena masih membutuhkan uji lanjutan histopatologi (Whidyastuti, 2019). Sistem limfatik terdiri dari organ limfoid primer dan limfoid sekunder. Organ limfoid primer terdiri dari sumsum tulang dan timus yang berperan dalam membuat sel limfosit, sedangkan organ limfoid sekunder terdiri dari limpa, kelenjar getah bening, amandel, dan jaringan tertentu di berbagai lapisan selaput lendir di tubuh yang menyimpan limfosit untuk melawan sumber infeksi (Boehm & Bleul, 2007).



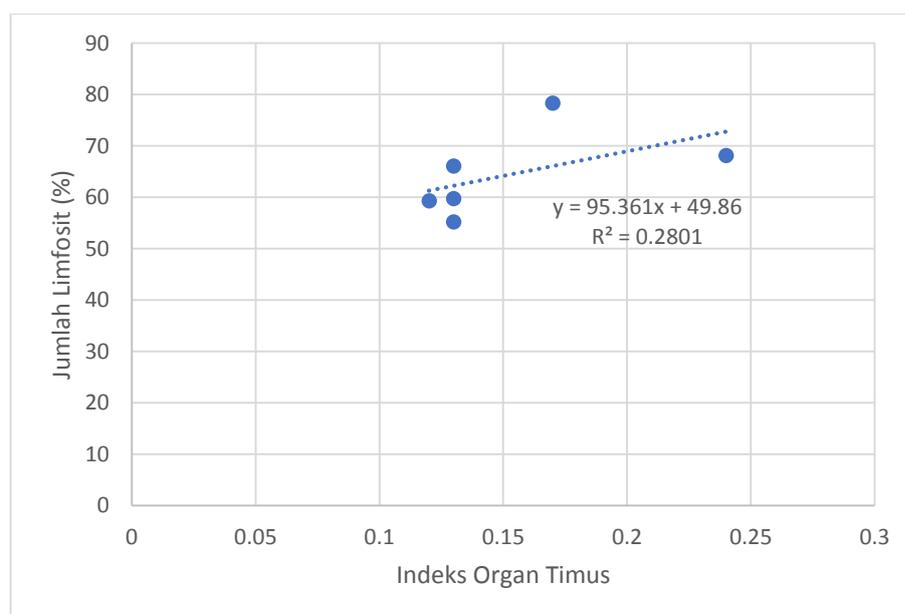
**Gambar 3.** Nilai indeks organ limfoid berupa timus dan limpa mencit jantan yang diinduksi CFA. Keterangan : KS (kontrol sehat), KN (perlakuan kontrol

negatif), KP (perlakuan kontrol positif), EEBC1 (perlakuan EEBC dosis 1 = 209,25 mg/g BB), EEBC2 (perlakuan EEBC dosis 2 = 418,5 mg/g BB), EEBC3 (perlakuan EEBC dosis 3 = 627,72 mg/g BB).

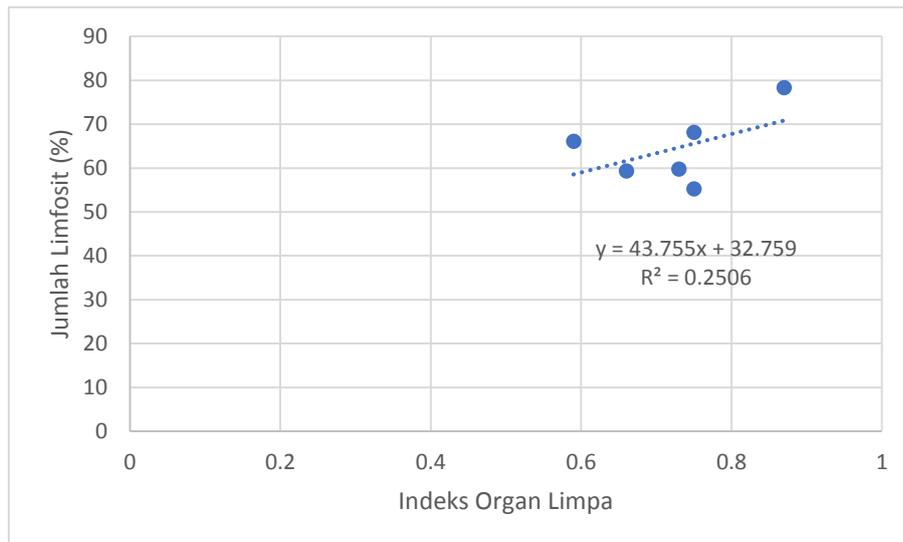
Seperti yang disajikan pada Gambar 3, nilai indeks organ timus berkisar antara 0,12% - 0,24%, sedangkan nilai indeks limpa berkisar antara 0,59% - 0,87%. Hasil uji statistik dengan ANOVA ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak bayam Brasil dengan dosis 209,25 mg/g BB berpengaruh paling besar terhadap, sedangkan tidak ada satu pun ragam dosis ekstrak daun Bayam Brasil yang berpengaruh besar terhadap berat organ limpa.

Hasil penelitian Makiyah (2014) menyebutkan bahwa adanya kenaikan berat organ limfoid, baik limpa ataupun timus, bisa disebabkan oleh naiknya jumlah sel limfosit yang diproduksi. Hasil penelitian Djama (2022) juga menyebutkan bahwa induksi SDMD yang merupakan antigen asing bagi tubuh mencit memberikan pengaruh

penambahan berat limpa. Untuk mendapatkan gambaran tentang hubungan antara jumlah limfosit dengan indeks organ limfoid, baik timus atau limpa, dilakukan uji regresi sederhana. Hasil uji yang disajikan pada Gambar 4 dan 5 menunjukkan adanya hubungan tersebut meskipun dalam nilai yang rendah, dimana hubungan pengaruh antara nilai relatif (NR) limfosit dan indeks timus adalah sebesar 28,01% ( $R = 0,2801$ ) dan hubungan pengaruh NR limfosit dengan indeks limpa adalah sebesar 25,06% ( $R = 0,2506$ ). Rendahnya relasi antara NR limfosit mencit dengan indeks organ limfoidnya diduga disebabkan karena produksi limfosit yang sudah kembali mengarah ke tahapan normal karena antigen CFA sudah tereliminiasi dengan baik pada hari terakhir penelitian.



**Gambar 4.** Analisis Regresi hubungan indeks organ timus dan nilai relatif limfosit



**Gambar 5.** Regresi hubungan indeks organ limpa dan nilai relatif limfosit.

Secara umum, hasil penelitian ini menunjukkan potensi pemanfaatan ekstrak daun Bayam Brasil untuk modulasi sel imun berupa limfosit dalam merespon antigen asing penyebab inflamasi. Pemanfaatan daun Bayam Brasil sangat terbuka untuk diarahkan sebagai sumber imunomodulator alami karena ragam senyawa fitokimia dan vitamin yang dikandungnya, terutama vitamin E sebagai senyawa dominan dalam daun bayam Brasil (Wuni *et al.*, 2022; Limeranto, 2022). Informasi tentang banyaknya kandungan vitamin E dalam daun bayam Brasil, dimana vitamin E tersebut berfungsi sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi, menjadikan tanaman bayam Brasil layak menjadi sumber nutrisi penunjang kesehatan tubuh.

### Kesimpulan

Ekstrak etanol daun Bayam Brasil mengandung fitokimia berupa flavonoid, alkaloid dan saponin, tanin dan steroid. Ekstrak etanol daun bayam Brasil juga diketahui mengandung flavonoid total sebesar 86,25 mg QE/g dan vitamin E sebesar 375,7 mg/100g).

Ekstrak etanol daun Bayam Brasil mampu menghambat efek antigen CFA pada mencit yang mengakibatkan akumulasi leukosit. Dosis terbaik ekstrak etanol daun Bayam Brasil yang bisa menurunkan jumlah limfosit dan nilai indeks organ timus mencit terinduksi CFA adalah dosis 3 sebesar 627,72 mg/g BB.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta pemberian Dana Penelitian Tenaga Pengajar Tahun 2023 untuk pembiayaan penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai, S. (2016), Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Elsevier
- Aldi, Y., Dewi, O. N., & Uthia, R. (2016). Uji Imunomodulator dan Jumlah Sel Leukosit Dari Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) Pada Mencit Putih Jantan. *Scienta*.

- Jurnal Farmasi dan Kesehatan 6(2):139
- Aminah, A., Tomayahu, N., & Abidin, Z. (2017). Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol kulit buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226-230.
- Anonim. (2000). Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. *Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia*, 3-30.
- Aria, M., Wardi, E. S., & Ayu, S. P. (2020). Uji Efek Anti-inflamasi Ekstrak Etanol Daun Piladang (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.) yang diberikan secara Topikal terhadap Mencit Putih Betina. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 17(1), 71-79.
- Arif, M. 2009. Penuntun Praktikum Hematologi. Universitas Hasanudin
- Block, K. I., & Mead, M. N. (2003). Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: a review. *Integrative cancer therapies*, 2(3), 247-267.
- Boehm, T., & Bleul, C. C. (2007). The evolutionary history of lymphoid organs *Nature immunology*, 8(2), 131-135.
- Bronte, V., & Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39(5), 806-818
- Casas, C. (2007). *Vitamins. Analysis of Cosmetic Products*, 364–379.
- Chotimah, C. (2019). *Uji total flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun dan kulit batang Dadap Serep (Erythrina subumbrans (Hassk.) Merr.) menggunakan pelarut yang berbeda* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., McGready, R., Proux, S., Newton, P., Pukrittayakamee, S., ... & White, N. J. (2002). Central role of the spleen in malaria parasite clearance. *Journal of Infectious Diseases*, 185(10), 1538-1541.
- Della Corte, C. M., & Morgillo, F. (2019). Early use of steroids affects immune cells and impairs immunotherapy efficacy. *Esmo Open*, 4(1).
- Grebenstein, N., Schumacher, M., Graeve, L., & Frank, J. (2014).  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein is not required for the discrimination against  $\gamma$ -tocopherol in vivo but protects it from side-chain degradation in vitro. *Molecular nutrition & food research*, 58(5), 1052-1060.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia. Terjemahan: Padmawinata, K dan Soediro, I. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Jiang, L., Zhang, G., Li, Y., Shi, G., & Li, M. (2021). Potential application of plant-based functional foods in the development of immune boosters. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 637782.
- Khalishah, H., Kurniawan, H., Nugraha, F., Nurbaeti, S., & Fajriaty, I. (2021). Pengaruh pemberian serbuk cangkang telur terhadap bobot badan dan indeks organ tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) galur wistar dalam 28 hari. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 5(1).
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.

- Lan, W. C., Tzeng, C. W., Lin, C. C., Yen, F. L., & Ko, H. H. (2013). Prenylated flavonoids from *Artocarpus altilis*: Antioxidant activities and inhibitory effects on melanin production. *Phytochemistry*, 89, 78-88.
- Lluis, J.M. & Morales, A. (2008). Hipoxia y reperfusion. In: Radicales libres y stress oxidative. Aplicaciones médicas. Manual Moderno, Mexico, D.F, pp. 169–182.
- Limeranto, D.M., Madyaningrana, K., dan Prakasita, V. C. (2022). *Pengaruh Ekstrak Bayam Brasil (Alternanthera sissoo hort) Pada Profil Hemoglobin, Hematokrit, dan Eritrosit Mencit (Mus musculus) yang Diinduksi Dengan Sodium Nitrit (NaNO<sub>2</sub>) Skrining Fitokimia dan Aktivitas Ekstrak Etanol Bayam Brazil*. Skripsi. Fakultas Bioteknologi. Universitas Kristen Duta Wacana: Yogyakarta.
- Liu, E., & Fan, J. (Eds.). (2017). *Fundamentals of laboratory animal science*. CRC Press.
- Ribeiro, Daniela; Freitas, Marisa; Lima, José L. F. C.; Fernandes, Eduarda (2015). *Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. Medicinal Research Reviews*.
- Prananda Y. Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun simpur (*Dillenia indica* L.) terhadap histopatologi organ hati pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) galur wistar [Skripsi]. Universitas Tanjungpura; 2018. Hal.92-97.
- Polak, E., Stępień, A., Gol, O., & Tabarkiewicz, J. (2021). Potential immunomodulatory effects from consumption of nutrients in whole foods and supplements on the frequency and course of infection: preliminary results. *Nutrients*, 13(4), 1157.
- Septianto, R., Ardana, I., Sudira, I., & Dharmayudha, A. (2015). Profil Hematologi Mencit Pasca Pemberian Jamu Temulawak Secara Oral. *Buletin Veteriner Udayana*, 34-40.
- Septianto, R., Ardana, I., Sudira, I., & Dharmayudha, A. (2015). Profil Hematologi Mencit Pasca Pemberian Jamu Temulawak Secara Oral. *Buletin Veteriner Udayana*, 34-40.
- Spelman K., Burns J., Nichols D., Winters N., Ottersberg S., dan Tenborg M. 2006. Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines : A Review of Herbal Immunomodulator, *Alternative Medicine Review*, 11 (2): 128-50.
- Steinman, R. M. (2012). *Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. Annual Review of Immunology*, 30(1), 1–22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
- Tamelan, C., Madyaningrana, K., & Prakasita, V. (2022). The Effect of Kesambi Bark Extract on Mice Lymphocyte Count and Spleen Index. *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan)*, 8(2), 195-206.
- Traber, M. G. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 347-362.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology and medicine*, 43(1), 4-15.
- Wendersteyt, N. V., Wewengkang, D. S., & Abdullah, S. S. (2021). Uji Aktivitas Antimikroba Dari Ekstrak Dan Fraksi Ascidian *Herdmania momus* Dari Perairan Pulau Bangka

Likupang Terhadap Pertumbuhan Mikroba *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *Candida albicans*. *PHARMACON*, 10(1), 706-712.

Whika, F. D., Leni, R., & Ismi, R. (2017). Rendemen dan Skrining Fitokimia pada Ekstrak Daun *Sansevieria sp.* *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 17(3), 197-202.

Wuni, P. M., Madyaningrana, K., dan Prakasita, V. C. (2022). Efek Ekstrak Daun Bayam Brasil (*Alternanthera sissoo hort*) Terhadap Jumlah Limfosit dan Indeks Organ Timus dan Limpa Mencit Jantan. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences* 9(2): 397-406.

