

**Uji Daya Imunitas Sediaan Daun Sungkai (*Peronemacanes Jack*)
PADA MENCIT (*Mus. musculus*)
Syaiful bahri¹, Yuli Ambarwati¹, Pandu Tris Mahendra¹**

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
Jl. Soemantri Brojonegoro No 1 Bandar Lampung

*Email korespondensi: syaiful.bahri@fmipa.unila.ac.id
Dikirim: 25-03-2022, Diterima: 25-04-2022, Diterbitkan: 02-05-2022

Abstrak

Tanaman sungkai (*Peronemacanes Jack*) adalah salah satu tumbuhan yang ada di Indonesia dan tersebar di beberapa wilayah khususnya pulau Sumatra dan Kalimantan. Potensi tanaman sungkai tersebut tidak hanya memberikan keuntungan untuk konservasi alam, bahan baku industri furnitur, bangunan, maupun mebel, tapi juga memiliki manfaat sebagai tanaman obat. Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi dan memperoleh senyawa bioaktif metabolit sekunder yang diekstrak dari daun tumbuhan sungkai, serta diuji bioaktivitasnya sebagai imunitas terhadap mencit (*Mus. musculus*). Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut yang sesuai. Uji fitokimia senyawa metabolit sekunder menunjukkan hasil positif terhadap uji alkaloid. Fraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV), uji fraksi dengan kromatografi lapis tipis (KLT), pemisahan dan pemurnian menggunakan kromatografi kolom (KK) dan KLT. Data dianalisis menggunakan ANOVA dan uji LSD sehingga diperoleh hasil penambahan 0,1 mL/kg bb ekstrak daun sungkai mampu meningkatkan jumlah leukosit sebesar 36% dibandingkan dengan obat pembanding (imunos) yang hanya mampu meningkatkan jumlah leukosit sebesar 23%. Hasil analisis UV-VIS menunjukkan adanya absorbansi pada 277-280 cm⁻¹ mengindikasikan bahwa senyawa tersebut merupakan suatu senyawa turunan ester yang didukung oleh data FTIR dengan adanya serapan pada rentang absorbansi 1735 cm⁻¹ yang merupakan suatu ester. Kemungkinan senyawa merupakan senyawa turunan Terpenoid.

Kata kunci: senyawa bioaktif, daun sungkai (*Peronemacanes Jack*), imunitas, mencit (*Mus. musculus*)

1. Pendahuluan

Tanaman obat telah banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional baik dalam bentuk produk jamu, herbal maupun fitofarmaka (BPOM, 2015), karena memiliki sifat untuk mencegah (preventif) dan promotif melalui kandungan senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh (*immunesystem*) (Salim and Munadi, 2017).

Tanaman sungkai (*Peronemacanes Jack*) menjadi salah satu tanaman obat yang dilaporkan telah banyak dimanfaatkan sebagai obat seperti obat malaria (Kuswantoro, 2017), antiplasmodium (Andriani et al., 2017); (Prasiwi et al., 2018) pestisida, antipiretik, imunitas, dan teratogenitas. Kandungan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak daun sungkai dilaporkan terdapat golongan senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, dan tanin (Ibrahim and Kuncoro, 2012), serta tujuh jenis senyawa *clerodane* diterpenoid yaitu peronemin A₂, A₃, B₁, B₂, B₃, C₁, dan D₁ (KITAGAWA et al., 1994); (Halim et al.).

Penelitian (Yani and Putranto, 2014) melaporkan bahwa ekstrak daun sungkai yang diberikan pada mencit jantan sebagai hewan uji imunitas dengan dosis 0,567 mg/ kg BB mampu meningkatkan leukosit 36%. Berdasarkan hasil ini bahwa daun sungkai memiliki potensi untuk digunakan sebagai imunitas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi senyawa bioaktif metabolit sekunder yang diekstrak dari daun sungkai memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat tradisional khususnya produk fitofarmaka imunitas sejalan dengan kebijakan pemerintah Indonesia.

2. Metode

Tahapan penelitian dilakukan melalui tahapan berikut:

1. Pengambilan dan Persiapan Sampel

a. Proses ekstraksi

Ekstraksi bubuk daun sungkai dilakukan menggunakan metode maserasi (Ahmad and Ibrahim, 2015). Sebanyak 2,5 kg bubuk tersebut direndam (dimaserasi) menggunakan pelarut metanol 1x24 jam dengan pengulangan 3

kali. Kemudian, maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh kemudian ditimbang.

b. Proses partisi

Selanjutnya, ekstrak pekat metanol disuspensi menggunakan pelarut metanol-air. Kemudian dilakukan partisi menggunakan pelarut n-heksan, sehingga diperoleh fraksi n-heksan dan fraksi air. Untuk fraksi air, dipartisi menggunakan pelarut etil asetat sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Baik fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat, dievaporasi pada suhu 30-40 °C sehingga diperoleh ekstrak kasar n-heksan dan etil asetat.

2. Uji fitokimia

Uji fitokimia mengadopsi dari metode (Fransisca et al., 2020). Uji dilakukan terhadap ekstrak kasar metanol, n-heksan, dan etil asetat untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder.

a. Uji saponin

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah akuades 5 mL, dan dikocok sekitar 30 detik. Hasil positif saponin apabila timbul busa selama 15 menit.

b. Uji terpenoid dan steroid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan asam asetat glasial dan H₂SO₄ pekat. Hasil positif terpenoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah dan ungu, sedangkan hasil positif steroid ditandai dengan warna hijau dan biru.

c. Uji alkaloid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 5 tetes kloroform dan pereaksi Meyer. Larutan yang memberikan warna putih kecokelatan menunjukkan uji positif alkaloid.

d. Uji flavonoid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 0,5 g serbuk Mg dan 5 mL HCl pekat sedikit demi sedikit. Apabila larutan berubah menjadi warna merah atau kuning menunjukkan uji positif flavonoid.

3. Fraksinasi, pemisahan, dan pemurnian

Proses fraksinasi, pemisahan, dan pemurnian mengadopsi metode dari (Ningsih and Ibrahim, 2013). Masing-masing sampel ekstrak kasar difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Sebelum dilakukan KCV, terlebih dahulu dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen dengan perbandingan tertentu untuk mengetahui jumlah komponen, kemurnian sampel, dan sistem pelarut yang akan digunakan pada kromatografi kolom gravitasi (KKG). Kolom KCV dimasukkan dengan gel silika Merck G 60 sebanyak 10 kali berat sampel, dan divakum. Eluen dimasukkan berurutan berdasarkan tingkat kepolaran rendah ke tinggi, dan divakum hingga siap digunakan. Sampel dilarutkan dalam aseton, dimpregnasi dengan gel silika merck G 60, dan dimasukkan dibagian atas kolom. Proses elusi digunakan eluen etil asetat : n-heksana 0% sampai etil asetat 100%. Fraksi-fraksi hasil elusi dari masing-masing pelarut ditampung, dan dimonitoring menggunakan metode KLT menggunakan eluen pelarut yang sesuai, baik tunggal maupun campuran pelarut dengan perbandingan tertentu. Noda atau bercak KLT dilihat menggunakan lampu UV λ 254 nm, dan divisualisasi menggunakan larutan serum sulfat. Nilai *Retention factor* (Rf) dari setiap noda fraksi dihitung, dan dicatat. Untuk fraksi dengan nilai Rf sama digabung untuk difraksinasi lebih lanjut dan diuji bioaktivitasnya. Fraksi yang bersifat aktif kemudian di uji KLT kembali, dipisahkan, dan dimurnikan menggunakan KKG yang telah dimasukkan silika merck 60 GF254 (63-200 μ m) pada kolomnya untuk mendapatkan pemisahan yang baik dan diperoleh *lead compound* yang murni.

4. Analisis kemurnian

Analisis kemurnian pada *lead compound* dilakukan menggunakan uji KLT dan uji titik leleh sesuai prosedur (Hidayati, 2020). Uji KLT terhadap *lead compound* menggunakan beberapa campuran eluen dan divisualisasi menggunakan larutan serum sulfat. Uji titik leleh dilakukan terhadap sampel *lead compound* yang telah dibuat dalam bentuk bubuk kristal dan dilelehkan menggunakan alat pengukur titik leleh.

5. Uji bioaktivitas terhadap mencit

Uji bioaktivitas menggunakan ekstrak kasar sebelum pemurnian dan *lead compound* terdiri dari uji imunitas dan perhitungan jumlah leukosit mengadopsi metode dari (Yani and Putranto, 2014)

a. Uji imunitas

Uji imunitas dilakukan secara eksperimental *in vivo* terhadap mencit putih (*Mus. musculus*) jantan galur *swisswebster*. Sebanyak 25 ekor mencit dengan umur 7-8 minggu, dan berat badan berkisar antara 30 g dibagi dalam 5 kelompok.

Tabel 2. Perlakuan uji imunitas terhadap mencit

Perlakuan	Dosis ekstrak kasar/ <i>lead compound</i> (mg/kgbb)	Dosis imunos (mg/30 gbb)	Jumlah mencit (ekor)
P1 kontrol (-) air	0	-	5
P1 kontrol (+)	0	0,07	5
P2	0,186	-	5
P3	0,375	-	5
P4	0,5625	-	5

Lima kelompok tersebut yaitu, kelompok P1 kontrol (-) yang diberi air, kelompok P1 kontrol (+) yang diberikan imunos, dan kelompok yang diberikan tiga macam dosis bertingkat, yaitu P2, P3, dan P4. Uji perlakuan dilakukan dengan satu kali gavage, pada siang hari selama 24 jam.

b. Perhitungan jumlah leukosit

Sampel darah mencit dari masing-masing perlakuan diambil melalui ekornya mulai tahap pengambilan hingga pengamatan mikroskop dengan pembesaran 40X. Hasil dihitung menggunakan persamaan :

$$\text{Jumlah sel darah putih (SDP)} = N_e \times p \times 2$$

Keterangan : N_e yaitu jumlah sel-sel darah putih hasil pengamatan mikroskop dalam 4 kotak besar bagian pinggir, dan p adalah pengenceran.

6. Karakterisasi *lead compound*

Sampel *lead compound* yang sudah murni dianalisis menggunakan Spektrofotometri Ultraungu-tampak (UV-Vis), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), dan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) (Ningsih and Ibrahim, 2013).

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian yang diperoleh sebagai berikut:

1. Pengambilan dan Persiapan Sampel

Daun sungkai diambil di desa Setia Negara, Kecamatan Baradatu, Way Kanan, Lampung, Indonesia dengan titik koordinat -4.852322LS dan 104.888902BT. Sampel daun sungkai yang telah kering digiling hingga menjadi bubuk, selanjutnya ditimbang untuk digunakan pada tahap selanjutnya. Diperoleh hasil bubuk daun sungkai sebanyak 5 kg (Gambar 7)



Gambar 7. Bubuk Daun Sungkai

2. Ekstraksi bubuk daun sungkai

a. Proses ekstraksi

Ekstraksi bubuk daun sungkai dilakukan menggunakan metode maserasi dilakukan dengan merendam 2,5 kg bubuk tersebut menggunakan pelarut metanol 1x24 jam dengan pengulangan 3 kali. Hasil penelitian Utami *et al.* (2015) menunjukkan bahwa metode ekstraksi akan berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan kandungan senyawa bioaktif yang bertindak sebagai antioksidan. Metanol digunakan dalam proses maserasi dilakukan dengan tujuan bahwa metanol memiliki sifat universal dan mampu melarutkan analit yang bersifat polar dan *nonpolar* seperti alkaloid, steroid, saponin dan flavonoid. Pada tahap ini diperoleh ekstrak metanol sebanyak 10 liter (Gambar 1)



Gambar 1. Proses Maserasi Bubuk Sungkai dan ekstrak metanol yang diperoleh dari hasil maserasi.

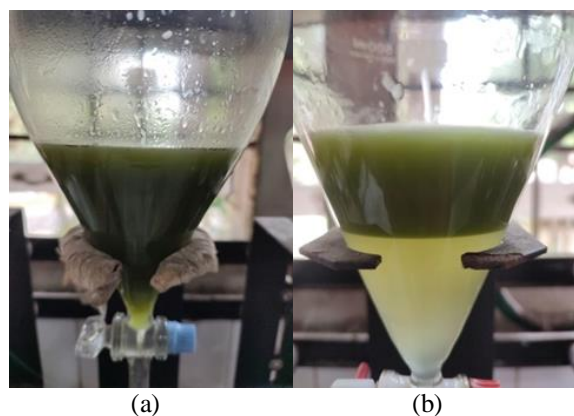
Maserat yang telah diperoleh selanjutnya dipekatan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh kemudian ditimbang dan diperoleh berat ekstrak kering metanol dengan berat 361,6 g.



Gambar 2. Proses pemekatan ekstrak metanol dan bobot ekstrak kering metanol yang diperoleh

b. Proses partisi

Ekstrak pekat metanol disuspensi menggunakan pelarut metanol-air. Kemudian dilakukan proses dipartisi dengan menggunakan perbandingan pelarut n-heksana 1:1,5, sehingga diperoleh fraksi n-heksan dan fraksi air. Untuk fraksi air, dipartisi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:2:2 sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Baik fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat, dievaporasi pada suhu 30-40 °C sehingga diperoleh ekstrak kasar n-heksan dan etil asetat.



Gambar 3. (a)Partisi ekstrak metanol dengan pelarut n-Heksana dengan perbandingan 1:1,5 (b) Partisi ekstrak metanol dengan pelarut Etil Asetat + Air dengan perbandingan Sampel : Etil Asetat : Air1 : 2 : 2

3. Uji Fitokimia

Uji fitokimia Uji dilakukan terhadap ekstrak kasar metanol, n-heksan, dan etil asetat untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder.

a. Uji saponin

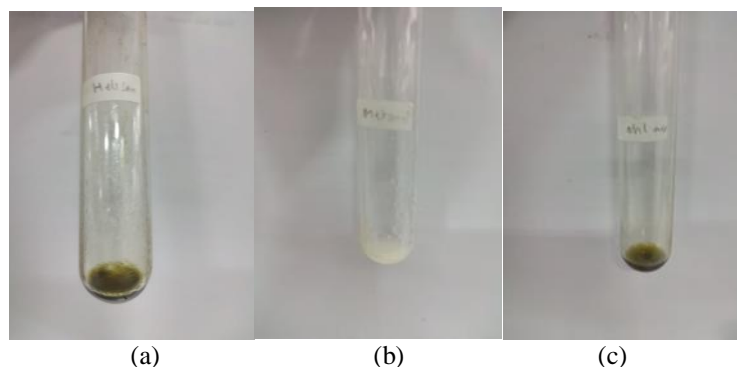
Ekstrak kasar masing-masing fraksi diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah akuades 5 mL, dan dikocok sekitar 30 detik. Hasil positif saponin apabila timbul busa selama 15 menit. Hasil menunjukkan bahwa tidak ada sampel yang menimbulkan busa pada uji ini sehingga dapat diasumsikan bahwa sampel tidak mengandung adanya saponin.

b. Uji terpenoid dan steroid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan asam asetat glasial dan H₂SO₄ pekat. Hasil positif terpenoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah dan ungu, sedangkan hasil positif steroid ditandai dengan warna hijau dan biru. Sampel yang diujikan tidak menunjukkan adanya warna merah dan ungu maupun timbulnya warna hijau dan biru, sehingga sampel memiliki hasil negatif dan sampel tidak mengandung terpenoid dan steroid.

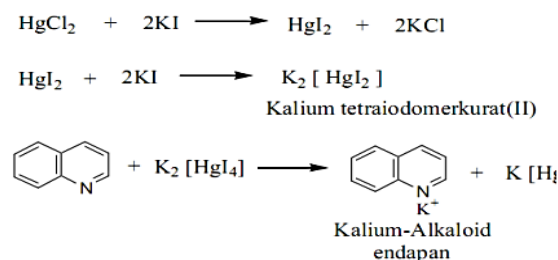
c. Uji alkaloid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 5 tetes kloroform dan pereaksi meyer. Larutan yang memberikan warna putih kecokelatan menunjukkan uji positif alkaloid. Hasil uji ini didapatkan hasil positif pada fraksi metanol yang ditandai dengan terbentuknya warna putih kecokelatan pada sampel fraksi metanol. (Gambar 4)



Gambar 4. (a) Uji alkaloid terhadap fraksi heksan (b) uji alkaloid terhadap fraksi metanol (c) uji alkaloid terhadap fraksi etil air

Senyawa alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas, sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam (McMurry,2004). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, atom nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K⁺ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi yang terjadi pada uji Mayer seperti pada Gambar 5 :



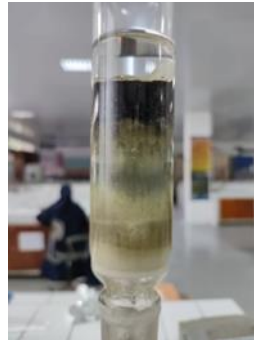
Gambar 5. Reaksi Uji Alkaloid

d. Uji flavonoid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 0,5 g serbuk Magnesium dan 5 mL HCl pekat sedikit demi sedikit. Apabila larutan berubah menjadi warna merah atau kuning menunjukkan uji positif flavonoid. Diperoleh hasil uji negatif pada seluruh fraksi sampel yang ditandai dengan tidak terbentuknya perubahan warna menjadi merah atau kuning pada sampel yang diuji.

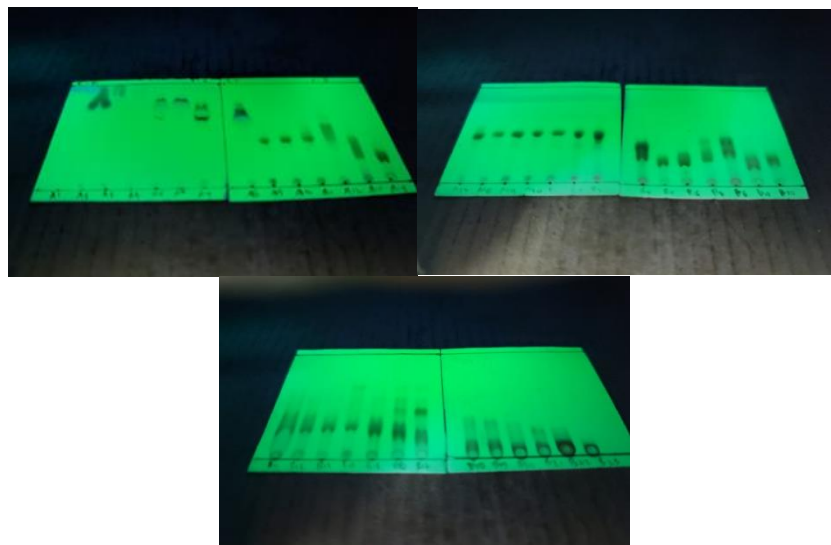
4. Fraksinasi, pemisahan, dan pemurnian

Sampel ekstrak kasar difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV) dengan menggunakan fasa gerak Etil Asetat : n-Heksana. Sebelum dilakukan KCV, terlebih dahulu dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen etil asetat : n-heksana dengan perbandingan 2:8 untuk mengetahui jumlah komponen, kemurnian sampel, dan sistem pelarut yang akan digunakan pada kromatografi kolom gravitasi (KKG). Kolom KCV dimasukkan dengan gel silika Merck G 60 sebanyak 10 kali berat sampel, dan divakum. Eluen dimasukkan berurutan berdasarkan tingkat kepolaran rendah ke tinggi, dan divakum hingga siap digunakan. 5 g ekstrak heksana dilarutkan dalam aseton, di impregnasi dengan gel silika merck G 60, dan dimasukkan dibagian atas kolom. Proses elusi digunakan eluen etil asetat : n-heksana 0% sampai etil asetat 100%. Pada tahap KCV diperoleh 43 fraksi yang kemudian akan dilakukan KLT. (Gambar 6)



Gambar 6. Pemurnian fraksi n-heksana dengan metode KCV

Fraksi-fraksi hasil elusi dari masing-masing pelarut ditampung, dan dimonitoring menggunakan metode KLT menggunakan eluen pelarut etil asetat : n-heksana dengan perbandingan 2 : 8. Noda atau bercak KLT dilihat menggunakan lampu UV λ 254 nm, dan divisualisasi menggunakan larutan serum sulfat. Nilai *Retention factor* (Rf) dari setiap noda fraksi dihitung, dan dicatat. (Gambar 7).

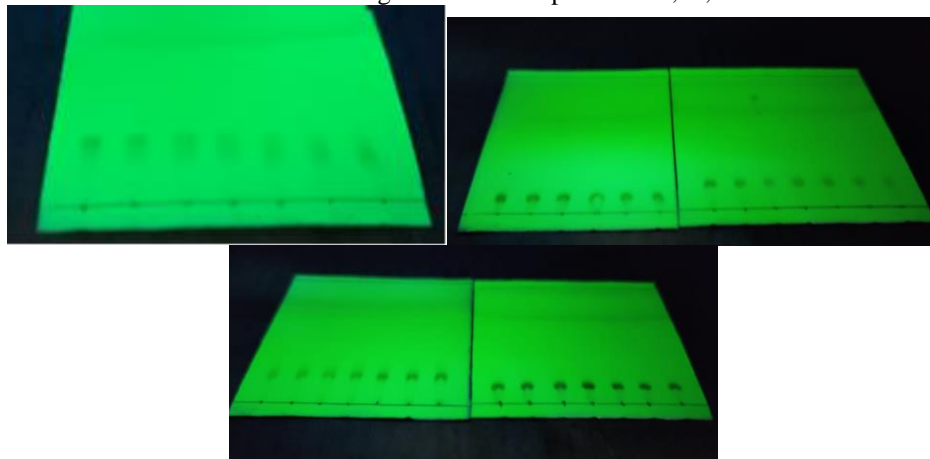


Gambar 7. Hasil KLT pada 43 fraksi

Fraksi yang bersifat aktif kemudian di uji KLT kembali, dipisahkan, dan dimurnikan menggunakan KKG yang telah dimasukkan silika merk 60 GF254 (63-200 μ m) pada kolomnya untuk mendapatkan pemisahan yang baik dan diperoleh *lead compound* yang murni. Berdasarkan hasil KLT dari 43 fraksi yang diperoleh dipilih sampel fraksi 9,10, dan 11 untuk dilakukan pemurnian lebih lanjut. Pemurnian sampel gabungan antara sampel 9,10 dan 11 dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Sebanyak 0,3 g ekstrak sampel di kolom dengan menggunakan fasa gerak etil asetat : n-heksana dengan perbandingan 1 : 9. Pada tahap ini diperoleh 41 fraksi yang akan dimurnikan lebih lanjut (Gambar 8)



Gambar 8. Kromatografi kolom sampel fraksi 9,10,dan 11



Gambar 9. Hasil KLT 41 Fraksi dari sampel 9,10,dan 11

5. Uji bioaktivitas terhadap mencit

Uji bioaktivitas menggunakan ekstrak kasar sebelum pemurnian dan *lead compound* terdiri dari uji imunitas dan perhitungan jumlah leukosit.

a. Uji imunitas

Uji imunitas dilakukan secara eksperimental *in vivo* terhadap mencit putih (*Mus. musculus*) jantan galur *swisswebster*. Sebanyak 25 ekor mencit dengan umur 7-8 minggu, dan berat badan berkisar antara 30 g dibagi dalam 5 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor *Mus musculus*. Berdasarkan hasil deskriptif, terlihat bahwa kelompok mencit yang diinduksi 0,1 ml ekstrak daun sungkai muda memiliki rata-rata jumlah leukosit yang paling tinggi yaitu sebesar 10795/mm³

Case Processing Summary							
	Kelompok_Perlakuan	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Jumlah_Leukosit	Kontrol Negatif	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	Kontrol Positif	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	0,1 ml Ekstrak	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	0,2 ml Ekstrak	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%
	0,3 ml Ekstrak	5	100.0%	0	0.0%	5	100.0%

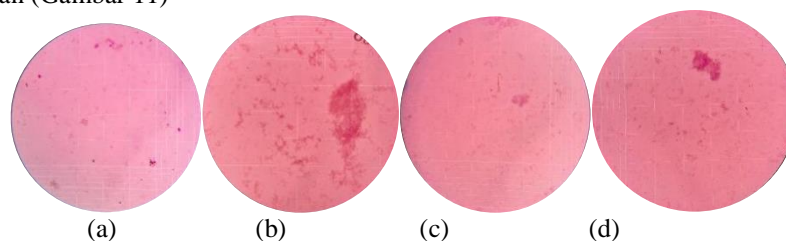
Tests of Normality							
	Kelompok_Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah_Leukosit	Kontrol Negatif	.343	5	.055	.800	5	.081
	Kontrol Positif	.206	5	.200*	.943	5	.686
	0,1 ml Ekstrak	.158	5	.200*	.981	5	.940
	0,2 ml Ekstrak	.201	5	.200*	.924	5	.553
	0,3 ml Ekstrak	.272	5	.200*	.796	5	.076

*. This is a lower bound of the true significance.
 a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives								
Jumlah_Leukosit								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	5	5290.00	559.743	250.325	4594.99	5985.01	4325	5750
Kontrol Positif	5	7620.00	541.237	242.049	6947.97	8292.03	7000	8300
0,1 ml Ekstrak	5	10795.00	1063.514	475.618	9474.47	12115.53	9500	12225
0,2 ml Ekstrak	5	6300.00	236.511	105.771	6006.33	6593.67	5950	6525
0,3 ml Ekstrak	5	4300.00	335.876	150.208	3882.96	4717.04	4000	4675
Total	25	6861.00	2368.138	473.628	5883.48	7838.52	4000	12225

Gambar 10. Hasil Analisis menggunakan ANOVA

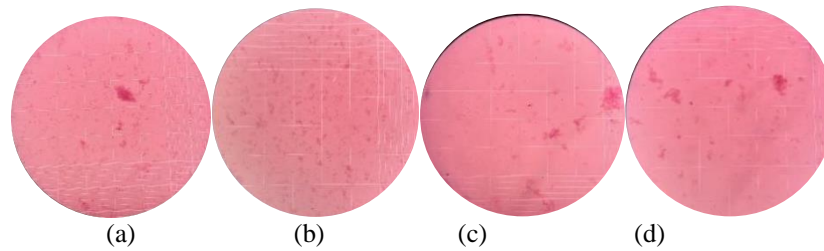
Pemberian ekstrak daun sungkai sebanyak 0,1 mL/kg bb dibandingkan dengan pemberian obat imunos sebanyak 0,2 mL/kg bb mampu meningkatkan penambahan leukosit dari keadaan awal sebelum pemberian ekstrak dengan sesudah penambahan (Gambar 11)



Gambar 11. (a) Keadaan awal penambahan 0,1 mL/kg bb ekstrak Sungkai 4, (b) keadaan akhir penambahan 0,1 mL/kg bb ekstrak sungkai 4, (c) keadaan awal penambahan 0,2 mL/kg bb imunos 4, (d) keadaan akhir penambahan 0,2 mL/kg bb imunos 4

Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan pemberian ekstrak daun sungkai pada mencit diketahui berpengaruh terhadap kekebalan tubuh. Leukosit merupakan sel pembentuk komponen darah, sehingga dengan meningkatnya kandungan sel darah putih maka dapat membantu tubuh melawan berbagai penyakit infeksi, sebagai bagian dari sistem kekebalan tubuh. Pemberian ekstrak daun sungkai lebih efektif dibanding dengan pemberian obat imunos sebanyak 0,2 mL/kg bb sebagai perbandingan. Imunos sebagai obat tunggal, sedangkan pada ekstrak sungkai mengandung beberapa zat aktif yaitu, peronemin, sitosterol, isopropanol, phytol, dipterpenoid, flavanoid sehingga memiliki unsur-unsur yang dapat membantu dalam proses menaikkan jumlah leukosit. Pada uji Imunitas dosis yang paling efektif dalam membantu sistem kekebalan tubuh dengan dosis ekstrak sungkai sebesar 0,1 mL/Kg bb, cenderung meningkatkan jumlah leukosit sebesar 36%, lebih baik daripada dosis perbandingan (imunos) hanya meningkatkan jumlah leukosit sebesar 23%.

Berbeda dengan perlakuan saat penambahan ekstrak daun sungkai sebanyak 0,2 mL/kg bb dan 0,3 mL/kg bb jumlah leukosit mengalami penurunan (Gambar 12)



Gambar 12.(a)keadaan awal penambahan ekstrak daun sungkai 4 0,2mL/kg bb, (b) keadaan akhir penambahan ekstrak daun sungkai 4 0,2mL/kg bb, (c) keadaan awal penambahan ekstrak daun sungkai 4 0,2mL/kg bb, (d) keadaan akhir penambahan ekstrak daun sungkai 4 0,2mL/kg bb.

Penurunan jumlah leukosit pada kelompok perlakuan yang lebih besar diduga karena kandungan vitamin C yang terdapat pada ekstrak daun sungkai sehingga penambahan berlebih akan berdampak pada tingkat toksisitas yang lebih tinggi.

b. Perhitungan jumlah leukosit

Sampel darah mencit dari masing-masing perlakuan diambil melalui ekornya mulai tahap pengambilan hingga pengamatan mikroskop dengan pembesaran 40X. Selanjutnya diperoleh hasil perhitungan jumlah leukosit sesuai tabel 1.

Tabel 1. Perhitungan jumlah leukosit

No.	Kelompok	Ulangan	Ruang Hitung				Jumlah Leukosit per mm kubik
			A	B	C	D	
1	Kontrol Negatif	1	46	61	59	57	5575
2		2	40	61	80	49	5750
3		3	41	38	52	42	4325
4		4	50	48	53	63	5350
5		5	47	67	47	57	5450
6	Kontrol Positif	1	81	85	89	77	8300
7		2	74	93	73	59	7475
8		3	85	63	65	78	7275
9		4	80	68	85	89	8050
10		5	75	62	70	73	7000
11		6	129	89	64	56	8450
12	Perlakuan I	1	122	144	135	88	12225
13		2	119	77	91	115	10050
14		3	85	113	117	122	10925
15		4	112	122	102	115	11275
16		5	98	86	100	96	9500
17	Perlakuan II	1	57	69	67	68	6525
18		2	63	59	74	64	6500
19		3	83	49	42	64	5950
20		4	56	76	52	64	6200
21		5	73	47	62	71	6325
22	Perlakuan III	1	51	46	37	53	4675
23		2	42	37	49	38	4150
24		3	50	32	46	32	4000
25		4	35	43	37	46	4025
26		5	39	54	50	43	4650

Diperoleh hasil nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ maka dapat diketahui bahwa rata-rata kelima kelompok perlakuan berbeda secara signifikan dan dapat dilakukan uji lanjutan

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah_Leukosit	Based on Mean	2.939	4	20	.046
	Based on Median	1.869	4	20	.155
	Based on Median and with adjusted df	1.869	4	11.759	.182
	Based on trimmed mean	2.891	4	20	.049

ANOVA					
Jumlah_Leukosit					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	126969600.0	4	31742400.00	83.267	.000
Within Groups	7624250.000	20	381212.500		
Total	134593850.0	24			

Gambar 13. Analisis data menggunakan ANOVA

Tahap analisis dilanjutkan dengan menggunakan LSD dan diketahui setiap kelompok perlakuan memiliki perbedaan rata-rata jumlah leukosit yang berbeda nyata dengan kelompok lainnya. Hal tersebut ditandai dengan tanda asteris (*) pada nilai selisih rerata (*MeanDifference*). (Gambar 14)

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: Jumlah_Leukosit							
LSD							
(I) Kelompok_Perlakuan	(J) Kelompok_Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-2330.000*	390.493	.000	-3144.55	-1515.45	
	0,1 ml Ekstrak	-5505.000*	390.493	.000	-6319.55	-4690.45	
	0,2 ml Ekstrak	-1010.000*	390.493	.018	-1824.55	-195.45	
	0,3 ml Ekstrak	990.000*	390.493	.020	175.45	1804.55	
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	2330.000*	390.493	.000	1515.45	3144.55	
	0,1 ml Ekstrak	-3175.000*	390.493	.000	-3989.55	-2360.45	
	0,2 ml Ekstrak	1320.000*	390.493	.003	505.45	2134.55	
	0,3 ml Ekstrak	3320.000*	390.493	.000	2505.45	4134.55	
0,1 ml Ekstrak	Kontrol Negatif	5505.000*	390.493	.000	4690.45	6319.55	
	Kontrol Positif	3175.000*	390.493	.000	2360.45	3989.55	
	0,2 ml Ekstrak	4495.000*	390.493	.000	3680.45	5309.55	
	0,3 ml Ekstrak	6495.000*	390.493	.000	5680.45	7309.55	
0,2 ml Ekstrak	Kontrol Negatif	1010.000*	390.493	.018	195.45	1824.55	
	Kontrol Positif	-1320.000*	390.493	.003	-2134.55	-505.45	
	0,1 ml Ekstrak	-4495.000*	390.493	.000	-5309.55	-3680.45	
	0,3 ml Ekstrak	2000.000*	390.493	.000	1185.45	2814.55	
0,3 ml Ekstrak	Kontrol Negatif	-990.000*	390.493	.020	-1804.55	-175.45	
	Kontrol Positif	-3320.000*	390.493	.000	-4134.55	-2505.45	
	0,1 ml Ekstrak	-6495.000*	390.493	.000	-7309.55	-5680.45	
	0,2 ml Ekstrak	-2000.000*	390.493	.000	-2814.55	-1185.45	

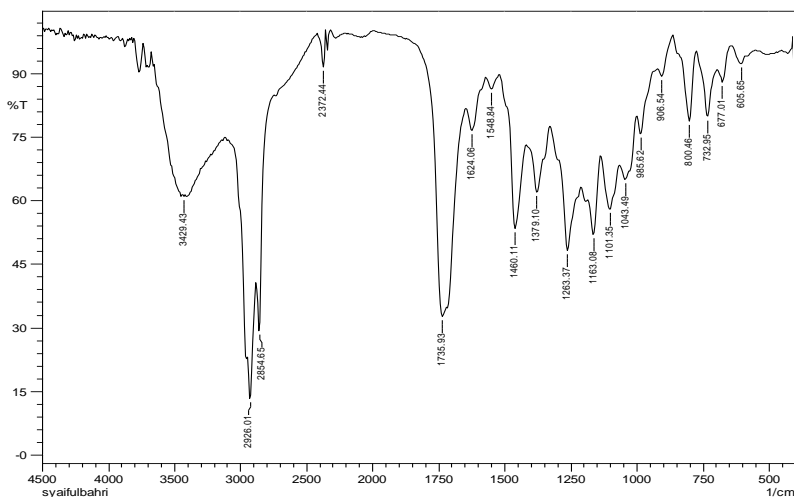
*, The mean difference is significant at the 0.05 level.

Gambar 14. Hasil Analisis data uji lanjut menggunakan LSD

6. Karakterisasi *Lead Compound*

a. Analisis FTIR

Hasil analisis FTIR yang diperoleh sebagai berikut:

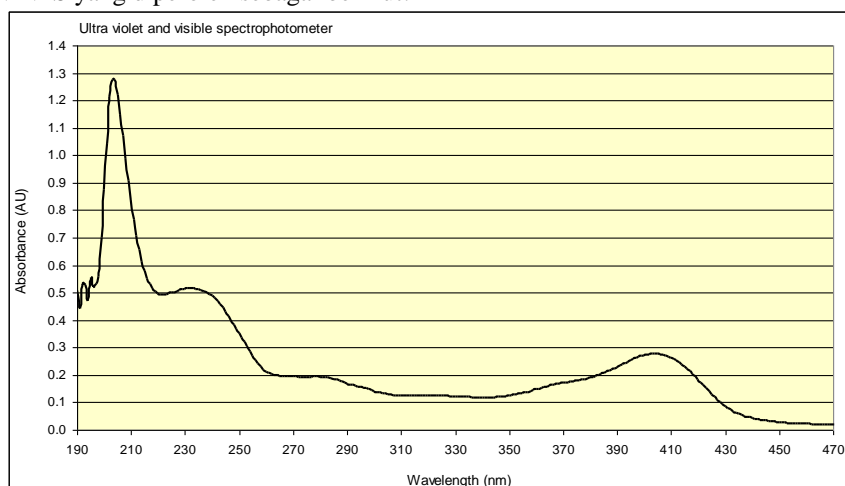


Gambar15. Spektrum IR senyawa hasil isolasi

Analisis menggunakan spektrofotometer IR memberikan informasi yang lebih lengkap tentang gugus fungsional yang terkandung dalam struktur senyawa hasil isolasi. Berdasarkan spektrum IR senyawa hasil isolasi menunjukkan bahwa pita serapan melebar dengan puncak serapan pada $3429,43\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi untuk gugus hidroksil (-OH). Serapan C-H alifatik yang terdapat dalam senyawa ini ditunjukkan oleh puncak serapan $3047,3\text{ cm}^{-1}$ dan $2947,0\text{ cm}^{-1}$. Serapan pada rentang $2854-2926\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan serapan C-H (alkana). Serapan pada rentang $2372,44\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan serapan O-H (Alkana). Dan serapan pada 1735 cm^{-1} menunjukkan serapan gugus ester.

b. Analisis UV-VIS

Hasil analisis UV-VIS yang diperoleh sebagai berikut:



Gambar 16. Spektrum Uv senyawa hasil isolasi

1. Wavelength = 204 nm Abs = 1,27440
2. Wavelength = 277 nm Abs = 0,51501
3. Wavelength = 277 nm Abs = 0,27670

Dengan melihat adanya pita yang muncul pada absorbansi $277-280\text{ cm}^{-1}$, mengindikasikan bahwa senyawa tersebut merupakan suatu senyawa turunan ester Kemungkinan senyawa merupakan senyawa turunan Terpenoid.

4. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Uji Fitokimia menunjukkan bahwa sampel fraksi metanol/heksana positif terhadap uji alkaloid yang ditandai dengan terbentuknya warna putih kecoklatan.
2. Pada tahap fraksinasi dan pemurnian sampel pertama dengan kromatografi cair vakum diperoleh jumlah fraksi sebanyak 43 fraksi
3. Pada tahap fraksinasi dan pemurnian sampel gabungan untuk fraksi 9,10,dan 11 dengan kromatografi cair vakum diperoleh jumlah fraksi sebanyak 41 fraksi.
4. Uji imunitas menunjukkan bahwa dosis yang paling efektif dalam membantu sistem kekebalan tubuh dengan dosis ekstrak sungkai sebesar 0,1mL/Kg bb dengan meningkatkan jumlah leukosit sebesar 36%
5. Perhitungan jumlah leukosit dengan analisis ANOVA menunjukkan hasil nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ dan pada analisis dengan menggunakan LSD diketahui setiap kelompok perlakuan memiliki perbedaan rata-rata jumlah leukosit yang berbeda nyata dengan kelompok lainnya.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada semua pihak yang membantu dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- AHMAD, I. & IBRAHIM, A. 2015. Bioaktivitas Ekstrak Metanol dan Fraksi n-Heksana Daun Sungkai (*Peronema canescens* JACK) terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach). *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1, 114-119.
- ANDRIANI, F., SUNDARYONO, A. & NURHAMIDAH, N. 2017. Uji Aktivitas Antiplasmodium Fraksi N-Heksana Daun *Peronema canescens* Terhadap Mus *Musculus*. *Alotrop*, 1.
- FRANSISCA, D., KAHANJAK, D. N. & FRETHERNETY, A. 2020. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer. *Jurnal Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan (Journal of Environmental Sustainability Management)*, 460-470.
- HALIM, K. F. K., JALANI, K. J., MOHSIN, H. F. & WAHAB, I. A. Original Research Article Phytochemical Screening of *Peronema Canescens* Jack.
- HIDAYATI, I. 2020. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Serta Uji Toksisitas Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).
- IBRAHIM, A. & KUNCORO, H. 2012. Identifikasi metabolit sekunder dan aktivitas antibakteri ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap beberapa bakteri patogen. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 2, 8-18.
- KITAGAWA, I., SIMANJUNTAK, P., HORI, K., NAGAMI, N., MAHMUD, T., SHIBUYA, H. & KOBAYASHI, M. 1994. Indonesian medicinal plants. VII. Seven new clerodane-type diterpenoids, peronemins A2, A3, B1, B2, B3, C1, and D1, from the leaves of *Peronema canescens* (Verbenaceae). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 42, 1050-1055.
- KUSWANTORO, F. 2017. Traditional Anti Malaria Plants Species of Balikpapan Botanic Garden, East Kalimantan-Indonesia. *KnE Life Sciences*, 78-85.
- NINGSIH, A. & IBRAHIM, A. 2013. Aktifitas Antimikroba Ekstrak Fraksi n-Heksan Daun Sungkai (*Peronema canescens*. JACK) terhadap Beberapa Bakteri dengan Metode KLT-Bioautografi. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 2, 76-82.
- PRASIWI, D., SUNDARYONO, A. & HANDAYANI, D. 2018. Aktivitas Fraksi Etanol Dari Ekstrak Daun *Peronema canescens* Terhadap Tingkat Pertumbuhan *Plasmodium berghei*. *Alotrop*, 2.
- SALIM, Z. & MUNADI, E. 2017. Info komoditi tanaman obat. *Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia*.
- YANI, A. P. & PUTRANTO, A. M. 2014. Examination of The Sungkai, s Young Leaf Extract (*Peronema canescens*) As An Antipiretic, Immunity, Anti plasmodium and Teratogenity In Mice (*Mus musculus*). *International Journal of Science and Engineering*, 7, 30-34.