

**EFEK IMUNOSUPRESIF EKSTRAK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan* L.) TERHADAP *Drosophila
melanogaster***

*IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF SECANG WOOD
EXTRACT (*Caesalpinia sappan* L.) IN *Drosophila
melanogaster**

NUR RAHMA RUMATA



**S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

TESIS

**EFEK IMUNOSUPRESIF EKSTRAK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan* L.) TERHADAP *Drosophila
melanogaster***

Disusun dan diajukan oleh

(NUR RAHMA RUMATA)

(N012181015)



**S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**EFEK IMUNOSUPRESIF EKSTRAK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan* L.) TERHADAP *Drosophila
melanogaster***

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

NUR RAHMA RUMATA

kepada

**S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**EFEK IMUNOSUPRESIF EKSTRAK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan* L.) TERHADAP *Drosophila
melanogaster***

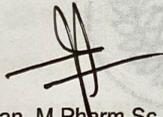
Disusun dan diajukan oleh

**(NUR RAHMA RUMATA)
(N012181015)**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian
Studi Program Magister Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas
Hasanuddin
pada tanggal 1 April 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

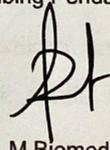
Menyetujui,

Pembimbing Utama



Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
Nip. 19750925 200112 1 002

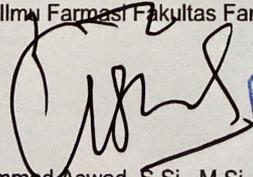
Pembimbing Pendamping



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
Nip. 19820610 200801 1 012

Ketua Program Studi Magister

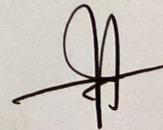
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi



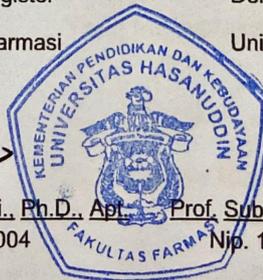
Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
Nip. 19800101 200312 1 004

Dekan Fakultas Farmasi

Universitas Hasanuddin,



Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
Nip. 19750925 200112 1 002



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nur Rahma Rumata
NIM : N012181015
Program studi : Farmasi
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

Efek Imunosupresif Ekstrak Kayu Secang
(*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap *Drosophila melanogaster*

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 1 April 2021

Yang Menyatakan



Nur Rahma Rumata
(Nur Rahma Rumata)

PRAKATA

Bismillahirrohmanirrohim, Alhamdulillah, puji dan syukur kehadiran Allah Swt atas segala rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Farmasi di Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini, penulis mengalami beberapa kendala dan tantangan dalam penyelesaian penelitian ini. Namun berkat doa, dukungan, bantuan serta semangat dari berbagai pihak, terkhusus keluarga penulis sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada Dekan/Wakil Dekan dan ketua Prodi Magister Farmasi serta Staf Dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar. Tak lupa, penulis menyampaikan terima kasih kepada Yth. Bapak Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku Ketua Komisi Penasehat dan Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D. Apt. selaku Anggota Komisi Penasehat atas arahan, bimbingan, bantuan serta motivasi yang diberikan mulai dari perencanaan, pelaksanaan penelitian dan meluangkan waktu serta pikiran sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan pengerjaan lintas negara yaitu Jepang dan Indonesia.

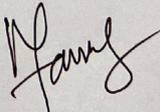
Terima kasih juga kepada anggota Komisi Penguji, Prof. Dr. Elly Wahyudin, D.E. A, Apt; Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt; dan Dr. Latifah Rahman, DESS, yang telah memberikan masukan, koreksi dan saran yang sangat dibutuhkan dalam penyusunan tesis ini.

Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Assoc. Prof. Takayuki Kuraishi dari Universitas Kanazawa dalam program KUEST-E karena telah mengizinkan penelitian ini terlaksana di *Host Defense and Responses Laboratory* dan telah memberikan banyak ilmu kepada penulis.

Ucapan terima kasih terutama penulis hanturkan kepada kedua orang tua ayahanda Samsudin Rumata, ibunda Fatmawati serta keluarga penulis yang telah mendoakan dan memberikan dukungan moril serta materi selama masa studi hingga terselesaikannya tesis ini.

Terakhir penulis ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan penelitian di *Host Defense and Responses Laboratory*, *UNHAS Fly Research Group*, KUEST-E dan rekan-rekan Magister Farmasi angkatan 2018, yang memberikan semangat dan pengalaman selama masa studi serta kepada seluruh pihak yang tidak tercantum namun telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Makassar, 28 Maret 2021



Nur Rahma Rumata

ABSTRAK

NUR RAHMA RUMATA. *Efek Imunosupresif Ekstrak Kayu Secang (Caesalpinia sappan L.) terhadap Drosophila melanogaster* (dibimbing oleh Subehan dan Firzan Nainu)

Salah satu tumbuhan obat yang memiliki aktivitas sebagai imunomodulator adalah batang kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas imunosupresif ekstrak etanol *Caesalpinia sappan* pada *D. melanogaster*. Dalam studi ini, dilakukan skrining fitokimia ekstrak dan uji *in vivo* pada level fenotip (berupa pengujian masa hidup, lokomotor dan reproduksi) dan genotip (berupa pengukuran level ekspresi gen *totA*, *dpt* dan *drs*) untuk menentukan aktivitas imunosupresif dan ekstrak *C. sappan* terhadap kondisi organisme model. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. sappan* mengandung alkaloid dan flavonoid serta ekstrak tersebut aman dikonsumsi oleh lalat Oregon-R dan mutan PGRP-LB. Dalam uji molekuler didapatkan hasil bahwa ekstrak *C. sappan* dapat menurunkan level ekspresi gen *totA*, *dpt* dan *drs* yang berhubungan dengan sistem imun. Pada pengujian masa hidup terlihat bahwa kematian lalat mutan PGRP-LB yang mengalami hiperaktivasi sistem imun berkurang dengan adanya ekstrak etanol *C. sappan*, mengindikasikan bahwa efek supresi sistem imun dapat menyelamatkan hidup organisme. Sebagai kesimpulan, ekstrak *C. sappan* dapat menurunkan aktivitas sistem imun organisme model lalat buah sehingga berpotensi besar untuk digunakan dalam pengobatan tradisional penyakit-penyakit terkait hiperaktivitas sistem imun seperti pada alergi dan autoimun.

Kata Kunci: *Caesalpinia sappan* L., lalat buah, imunosupresan, *totA*, *dpt*, *drs*, survival, masa hidup

ABSTRACT

NUR RAHMA RUMATA. *Immunosuppressive effects of Secang Wood Extract (Caesalpinia sappan L.) in Drosophila melanogaster* (supervised by Subehan and Firzan Nainu)

One of the medicinal plants which has an activity as an immunomodulator is secang heartwood (*Caesalpinia sappan* L.). This research was carried out to determine the immunosuppressive activity of ethanol extract of *Caesalpinia sappan* L. (*C. sappan*) in *Drosophila melanogaster*. Phytochemical screening of ethanol extracts in vitro assays at genotype levels (measurements the expression levels of *totA*, *dpt* and *drs*) and in vivo assays at the phenotypic (lifespan, locomotor and reproduction tests) were conducted to determine the immunosuppressive activities of *C. sappan* extract in the model organism. The results showed that the ethanol extract of *C. sappan* contains alkaloids and flavonoids. The extract was safe for consumption by Oregon-R and PGRP-LB mutant flies. Molecular tests indicated that *C. sappan* extract could reduce the expression level of *totA*, *dpt* and *drs* (genes related to the immune system). The lifespan tests, showed that the mortality of PGRP-LB mutant flies, mutant with hyperactivation of the immune system, was reduced by the presence of ethanol extract of *C. sappan*, indicating that the immune-suppressive effects could prolong the lifespan of flies. In conclusion, *C. sappan* extract might suppress *Drosophila* immune responses. Therefore, *C. sappan* has a great potential to use as traditional medicine treat overactive immune system conditions, such as allergies and autoimmune diseases.

Keywords: *Caesalpinia sappan* L., fruit flies, immunosuppressants, *totA*, *dpt*, *drs*, survival, life span

DAFTAR ISI

TESIS	i
LEMBAR PENGESAHAN TESIS	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	6
D. Manfaat Penelitian	6
BAB II	7
TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Secang	7
B. Ekstraksi	12
C. <i>Drosophila melanogaster</i>	15
D. Sistem Imun <i>Drosophila melanogaster</i>	20
E. Kerangka Teori	25
F. Kerangka Konsep	26
BAB III	27
METODE KERJA	27
A. Waktu dan Tempat Penelitian	27
B. Alat dan Bahan	27
C. Cara Kerja	28

BAB IV	43
HASIL DAN PEMBAHASAN	43
A. Pembuatan Ekstrak Kayu Secang	43
B. Uji Kandungan Kimia Ekstrak	44
C. Penentuan kelarutan ekstrak dalam etanol 70%	45
D. Uji Toksisitas Etanol 70%	46
E. Uji toksisitas ekstrak terhadap <i>Drosophila</i>	47
F. Uji Survival Oregon R	48
G. Uji Lokomotor Oregon R dengan atau Tanpa Ekstrak	51
H. Uji Reproduksi Oregon R	52
I. Uji Ekspresi Gen	55
J. Uji Survival Lalat Mutan <i>PGRP-LB</i>	65
K. Uji Lokomotor Lalat Mutan <i>PGRP-LB</i>	67
L. Uji Reproduksi Lalat Mutan <i>PGRP-LB</i>	68
BAB V	71
KESIMPULAN DAN SARAN	71
A. Kesimpulan	71
B. Saran	73
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	82

DAFTAR TABEL

nomor	halaman
1. Istilah deskriptif untuk perkiraan kelarutan	31
2. Prosedur penentuan kelarutan	33
3. Sekuens primer masing-masing gen	39
4. Hasil pengujian toksisitas etanol 70% pada <i>D. melanogaster</i>	46
5. Hasil pengujian ekstrak pada <i>D. melanogaster</i>	48

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Morfologi dari tumbuhan <i>Caesalpinia sappan</i> L.	8
2. Lalat buah <i>Drosophila melanogaster</i>	17
3. Siklus hidup lalat buah <i>Drosophila melanogaster</i>	18
4. Jalur Toll, IMD dan Jak/STAT	24
5. Skema kerangka teori	25
6. Skema kerangka konsep	26
7. Proses pembuatan ekstrak kayu secang	43
8. Hasil uji kandungan kimia ekstrak	44
9. Hasil uji kelarutan setelah penambahan 100 mL etanol 70%	45
10. Konsumsi EECS tidak menurunkan kelangsungan hidup	47
11. Larva lalat Oregon R	49
12. Hasil Survival assay <i>D. melanogaster</i> yang diberikan ekstrak <i>C. sappan</i> pada konsentrasi 0.4%	50
13. Hasil uji lokomotor <i>D. melanogaster</i> yang diberikan ekstrak <i>C. sappan</i> pada konsentrasi 0.4%	51
14. Larva lalat Oregon R	53
15. Jumlah pupa dari lalat Oregon R pada hari ke 3 dan ke 6	54
16. Perbandingan level ekspresi gen TotA	56

17. Perbandingan level ekspresi gen TotA	57
18. Perbandingan level ekspresi gen <i>dpt</i>	58
19. Perbandingan level ekspresi gen <i>drs</i>	59
20. Profil ekspresi gen <i>totA</i> (<i>turandot A</i>)	59
21. Perbandingan level ekspresi gen <i>turandot A</i>	60
22. Profil ekspresi gen <i>Diptericin</i>	61
23. Perbandingan level ekspresi gen <i>Diptericin</i>	62
24. Profil ekspresi gen <i>Drosomysin</i>	63
25. Perbandingan level ekspresi gen <i>Drosomysin</i>	64
26. Hasil survival assay	65
27. Hasil uji lokomotor	67
28. Larva lalat mutan PGRP-LB	69
29. Jumlah pupa dari lalat mutan PGRP-LB	69
30. Desain lokasi primer	88
31. Dokumentasi penelitian	90

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	halaman
1. Skema Kerja	82
2. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak	84
3. Cara pembuatan Pakan yang mengandung Ekstrak	86
4. Komposisi Pakan	87
5. Desain Lokasi Primer	88
6. Keterangan Determinasi Tanaman dari B2P2TOOT	89
7. Dokumentasi Penelitian	90

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan Keterangan
AMP	<i>Antimicrobial peptide</i>
APPs	<i>Acute-Phase Proteins</i>
BSC	<i>Biosafety Cabinet Class</i>
B2P2TOOT	Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO ₂	Karbondioksida
<i>C. sappan</i>	<i>Caesalpinia sappan</i>
DAP	<i>Diaminopimelic acid</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>Dpt</i>	<i>Diptericin</i>
<i>Drs</i>	<i>Drosomycin</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
F ₂₅₄	Flouresensi pada panjang gelombang 254 nm
G	Gram
GNBP3	<i>Gram Negative Bacteria Binding Protein 3</i>

IIS	<i>Insulin like growth factor signaling</i>
IκB	IkappaB
Imd	<i>Immune Deficiency</i>
JAK/STAT	<i>Janus Kinase/ Signal Transducer Activator of Transcription</i>
JH	<i>Juvenile Hormone</i>
Kg	Kilogram
Mdpl	Meter di atas permukaan laut
mL	Mililiter
Mg	Miligram
MYD88	<i>Myeloid differentiation Primary Response 88</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGRP	<i>Peptidoglycan Recognition Protein</i>
PGRP-LB	<i>Peptidoglycan Recognition Protein LB</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PSD-95	<i>Postsynaptic Density Protein 95</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	<i>RNA Interference</i>
<i>rp49</i>	<i>Ribosomal Protein 49</i>
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain</i>

	<i>Reaction</i>
<i>totA</i>	<i>Turandot A</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<i>Upd</i>	<i>Unpaired</i>
μL	Mikroliter

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Imunitas didefinisikan sebagai aksi pertahanan kekebalan tubuh terhadap berbagai jenis patogen yang menyebabkan gangguan berhubungan dengan imun (Murphy and Weaver, 2016).

Sistem kekebalan memegang peranan penting dalam kesehatan. *Host* dengan kekebalan yang terganggu kemungkinan akan rentan terhadap infeksi parah yang dapat memuncak dan dapat mengancam jiwa (Murphy and Weaver, 2016). Oleh karena itu, stimulasi respon imun *host* terhadap antigen/isyarat patogen tertentu melalui vaksinasi adalah metode yang paling efektif untuk melindungi *host* dari infeksi (Murphy and Weaver, 2016; Plotkin *et al.*, 2012). Selain itu, aktivasi imunitas seluler dan humoral bawaan inang oleh agonis tertentu dengan aktivitas imunomodulator telah menjadi pendekatan yang relevan untuk mengembangkan efektor perlindungan yang cepat dan luas terhadap mikroba patogen (Murphy and Weaver, 2016).

Sebaliknya, masalah yang berkaitan dengan aktivasi kekebalan yang berlebihan dan tidak diinginkan seperti alergi, penolakan transplantasi dan gangguan autoinflamasi/autoimunitas terjadi karena kegagalan katastropik pada diri sendiri dan non-pengenalan diri (Murphy and Weaver, 2016).

Dalam mengatasi masalah tersebut, obat-obatan dengan tindakan immunosupresif sangat dibutuhkan. Efek fenotip yang umum dari obat tersebut dicapai dengan penghambatan inflamasi, baik dengan penghambatan langsung reseptor/molekul yang bertanggungjawab dalam stimulasi inflamasi atau dengan menurunkan ekspresi sitokin pro-inflamasi (Murphy and Weaver, 2016). Oleh karena itu, kandidat obat dengan potensi sebagai immunosupresif akan memainkan peran yang berbeda dalam pengobatan gangguan terkait hiperaktivasi imun. Di era pandemi COVID 19, immunosupresan juga sangat dibutuhkan. Terutama bagi pasien COVID 19 yang berat, dimana terjadi sindrom badai sitokin (hiperinflamasi sistemik). Hal ini bisa menyebabkan syok, vasoplegia, kegagalan pernafasan bahkan kolaps kardiopulmoner sehingga keberadaan immunosupresan menjadi sangat dibutuhkan (Mehta *et al.*, 2020; Hasan and Mehra, 2020; Monteleone *et al.*, 2020).

Salah satu tanaman obat yang disarankan untuk aktivitas immunosupresan adalah *Caesalpinia sappan* L. (Wu *et al.*, 2011; Nirmal *et al.*, 2015). Secang, juga dikenal sebagai kayu secang mampu menekan respons kekebalan dengan dosis 5 mg/kg d, 10 mg/kg (Cao, *et al.*, 2018), 25 mg/kg b.w (Wu *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2005, Sunitha *et al.*, 2013) dan 50 mg/kg (Ye *et al.*, 2005) pada hewan uji tikus. Agen dengan aktivitas immunostimulasi disebut immunostimulator sedangkan agen dengan aktivitas mekanisme kerja penekanan sistem imun dari *C. Sappan* immunosupresi disebut immunosupresan (Murphy and Weaver, 2016).

Secang adalah salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional sebab memiliki beberapa senyawa bioaktif seperti brazilin, brazilein, 3'-O-methylbrazilin, protosappanin, sappanone, chalcone, sappanalcone dan komponen umum lainnya seperti asam amino, karbohidrat dan asam palmitat telah diidentifikasi dan diisolasi dari inti kayu *C. sappan* (Pawar *et al.*, 2008; Nirmal *et al.*, 2015).

Brazilin, senyawa flavonoid dengan karakteristik yang memberikan warna merah pada inti kayu secang telah dilaporkan memberikan efek perlindungan terhadap keracunan akibat radikal kimia (Nirmal *et al.*, 2015). Selain itu berbagai efek farmakologis baik ekstrak maupun senyawa yang terdapat pada kayu secang, mulai dari antibakteri dengan zona hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* yaitu 34 mm dan nilai MIC/MBC yaitu 0,5 mg/mL, antioksidan dengan IC₅₀ yaitu 8,8 µM, antiinflamasi dengan mekanisme penghambatan produksi NO pada J774. 1 *cell line* pada 30-100 µM dan penurunan iNOS (Nirmal *et al.*, 2015) hingga aktivitas sitotoksik terhadap *Human Cancer cell lines*, HepG2 & Hep3B (hati), MDA-MB-231 dan MCF-7 (*breast*) dan A549 (pulmonari) (Zanin *et al.*, 2012).

Telah diketahui bahwa sistem kekebalan manusia homolog dengan yang ditemukan pada beberapa model hewan termasuk tikus dan lalat buah yang terkenal (*Drosophila melanogaster*) (Lemaitre *et al.*, 2007; Buchon *et al.*, 2014). Sebagai organisme model, lalat buah menawarkan banyak keuntungan ketika digunakan dalam penelitian terkait imunitas.

Lalat buah dilengkapi dengan sistem kekebalan bawaan yang sebanding dengan manusia (Nainu *et al.*, 2017; Buchon *et al.*, 2014). Selain itu, lalat buah juga mudah dan relatif murah dalam pemeliharaannya jika dibandingkan dengan hewan model lain (Pandey and Nichols, 2011; Nainu *et al.*, 2019) dan lalat betina dapat menghasilkan keturunan dalam jumlah besar dengan waktu yang singkat sehingga dapat dilakukan pengujian reproduksi, yang memungkinkan percobaan skala besar dalam durasi yang singkat. Lalat buah juga memiliki masa hidup yang pendek (sekitar 2-3 bulan) dan dapat digunakan dalam penelitian tanpa persyaratan izin etika (Pandey and Nichols, 2011; Nainu *et al.*, 2019). Lalat buah hanya memiliki 4 kromosom sehingga dapat memudahkan dalam proses identifikasi molekuler seperti mekanisme penyusunan gen, pengaturan aktivitas dan fungsi gen, serta pola mutasinya (Nainu *et al.*, 2018).

Kemudian dengan menggunakan lalat buah juga dapat dilakukan pengujian lokomotor. Pengujian ini bertujuan untuk melihat gerakan pada lalat dimana gerak merupakan gambaran dari aktivitas sistem saraf. Gerakan yang baik akan ditunjukkan oleh aktivitas sensorik yang baik sebab gangguan sekecil apapun akan merusak kemampuan lalat untuk menggerakkan tubuhnya (Aman A. *et al.*, 2019).

Salah satu poin terpenting dalam menggunakan *Drosophila melanogaster* sebagai organisme model dalam penelitian terkait imunologi adalah kemiripan jalur sinyal sistem imun dengan manusia, seperti Toll

dan Imd yang terhubung dengan faktor transkripsi *nuclear factor-kB* (NF-kB), JAK/STAT, apoptosis, autofagi dan RNA interference (RNAi) (Nainu, 2018).

Selain itu, tidak adanya sistem imun adaptif pada lalat buah (Lemaitre *et al.*, 2007; Buchon *et al.*, 2014) akan memberikan lingkungan *in vivo* yang ideal untuk mempelajari regulasi farmakologis imunitas bawaan pada tingkat seluler dan molekuler untuk mendapatkan calon obat yang potensial dengan aktivitas imunostimulasi atau immunosupresi.

Hal inilah yang melatarbelakangi sehingga dapat dilakukan penelitian tentang efek immunosupresif ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap *Drosophila melanogaster* dengan menggunakan kontrol positif obat dexametasone yang biasa digunakan sebagai obat immunosupresan pada manusia. Hal ini dilakukan sekaligus untuk memvalidasi bahwa metode pengujian immunosupresan dengan menggunakan *Drosophila* akan memberikan efek yang sama ketika dilakukan pada manusia.

B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana efek immunosupresif dari ekstrak kayu secang terhadap *Drosophila melanogaster*?

C. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas immunosupresan yang terdapat di dalam ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan menggunakan *Drosophila melanogaster*.

D. Manfaat Penelitian

Untuk memperoleh data aktivitas immunosupresan yang terdapat di dalam ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan menggunakan *Drosophila melanogaster*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Secang

1. Klasifikasi tanaman

Berikut ini adalah klasifikasi tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) (Tjitrosoepomo, 1994; B2P2TOOT, 2019):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Subkelas	: Dialypetalae
Ordo	: Rosales
Famili	: Leguminosae
Genus	: <i>Caesalpinia</i>
Spesies	: <i>Caesalpinia sappan</i> L.
Sinonim	: <i>Biancaea sappan</i> (L.) Tod

2. Morfologi



Gambar 1. Morfologi dari tumbuhan *Caesalpinia sappan* L. dengan memperlihatkan buah, kayu dan inti kayu (*heartwood*) (Nirmal *et al.*, 2015)

Tumbuhan secang dapat ditemukan pada daerah tropis, tumbuh pada ketinggian 500-1000 m dpl (Astina, 2010). Habitus berupa tumbuhan semak atau perdu dengan tinggi 5-10 m. Batang berkayu, bulat dan berwarna hijau kecokelatan. Pada batang dan percabangannya, terdapat duri-duri tempel yang bentuknya bengkok dan letaknya tersebar (Hariana, 2006), cabang memiliki *lentisel* (Anonim, 2008). Akar tunggang berwarna coklat, sedangkan daunnya majemuk menyirip ganda dengan Panjang daun 25-40 cm, jumlah anak daun 10-20 pasang yang letaknya berhadapan (Hariana, 2006). Anak daun tidak bertangkai, bentuk lonjong, Panjang 10-25 mm, dan lebar 3-11 mm (Anonim, 2008).

Bunga secang tergolong bunga majemuk dengan bentuk malai, bunganya keluar dari ujung tangkai dengan Panjang 10-40 cm (Hariana, 2006). Panjang gagang bunga 15-20 cm, pinggir kelopak berambut, Panjang daun kelopak terbawah ± 10 mm, lebar ± 4 mm, tajuk memencar berwarna kuning, helaian bendera membundar bergaris tengah 4-6 mm, empat helai daun tajuk lainnya juga membundar dan bergaris tengah ± 10 mm, panjang benang sari ± 15 mm dan putik ± 18 mm (Anonim, 2008).

Buah tergolong buah polong, berbentuk lonjong dan pipih dengan panjang 8-10 cm, lebar 3-4 cm dan ujung seperti paruh berisi 3-4 biji, jika masak berwarna hitam. Biji bulat memanjang dengan panjang 15-18 mm, lebar 8-11 mm, tebal 5-7 mm dan berwarna kuning kecoklatan (Hariana, 2006).

3. Nama lain

Secang dikenal di berbagai daerah di Indonesia dengan nama lokal yang berbeda-beda seperti seupeng (Aceh); sepang (Gayo); sopang (Batak); cacang (Minangkabau); secang (Sunda); kayu secang, soga Jawa (Jawa); kayu secang (Madura); cang (Bali); sepang (Sasak); supu, suang (Bima); sepel (Timor); hong (Alor); kayu sema (Manado); dolo, sappang (Makassar); seppang (Bugis); sefen (Halmahera Selatan); sawala, hiniaga, sinyiang, singiang (Halmahera Utara); sunyiah (Ternate); dan roro (Tidore) (Anonim, 2008).

4. Kandungan kimia

Kandungan kimia yang terdapat pada kayu secang yaitu asam galat, tannin, resin, resorsin, brazilin, brazilein, d- α -phellandrene, oscime, dan minyak atsiri. Uji fitokimia menunjukkan bahwa kayu secang mengandung senyawa kimia dari kelompok alkaloid, flavonoid dan saponin. Senyawa fitokimia yang berperan sebagai antioksidan pada kayu secang adalah *brazilin* dan *flavonoid* (Sufiana & Harlia, 2012). Ekstrak kayu secang juga mengandung terpenoid yang tinggi (Widowati, 2011) serta memiliki beberapa senyawa bioaktif seperti brazilin, brazilein, 3'-O-methylbrazilin, protosappanin, sappanone, chalcone, sappanalcone dan komponen umum lainnya seperti asam amino, karbohidrat dan asam palmitat telah diidentifikasi dan diisolasi dari inti kayu *C. sappan* (Pawar *et al.*, 2008; Nirmal *et al.*, 2015).

Komposit brazilien merupakan senyawa sub tipe *brazilin* yang terdapat dalam kayu secang. Senyawa-senyawa yang termasuk ke dalam komposit ini yaitu brazilin, brazilein, dan 3-O-metilbrazilin dengan brazilin sebagai konstituen utama dari ekstrak kayu secang (Astina, 2010). Brazilin adalah senyawa flavonoid dengan berbagai efek farmakologis baik ekstrak maupun senyawa yang terdapat pada kayu secang, mulai dari antibakteri dengan zona hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* yaitu 34 mm dan nilai MIC/MBC yaitu 0,5 mg/mL, antioksidan dengan IC₅₀ yaitu 8,8 μ M, antiinflamasi dengan mekanisme penghambatan produksi NO pada J774. 1 *cell line* pada 30-100 μ M dan penurunan iNOS (Nirmal *et al.*, 2015)

hingga aktivitas sitotoksik terhadap *Human Cancer cell lines*, HepG2 & Hep3B (hati), MDA-MB-231 dan MCF-7 (*breast*) dan A549 (pulmonari) (Zanin *et al.*, 2012).

5. Manfaat

Bagian inti kayu (*heartwood*) dari *C. sappan* mengandung flavonoid yang larut dalam air yaitu, brazilin, protosappanin dan haematoxylin. Brazilin adalah konstituen homoisoflavonoid ditemukan di inti kayu *C. sappan*, yang dikenal sebagai pewarna warna merah alami untuk pewarnaan. Dalam pengobatan tradisional Tiongkok, brazilin digunakan untuk pengobatan peningkatan sirkulasi darah, meningkatkan menstruasi dan menunjukkan potensi analgesik dan anti-inflamasi. Brazilin yang merupakan *major compound* telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis termasuk antibakteri, anti-inflamasi, anti-photoaging, hipoglikemik, vasorelaxant, anti alergi, anti-jerawat, antioksidan dan aktivitas nuklease (Nirmal *et al.*, 2015).

Subehan *et al.*, (2014) mengemukakan bahwa ekstrak etanol kayu secang mampu menstimulasi proliferasi terhadap sel osteoblastik (*in vitro*). Selain itu, *Caesalpinia sappan* L. juga telah dilaporkan memiliki aktivitas immunosupresan (Wu *et al.*, 2011; Nirmal *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian Cao *et al.*, 2020 bahwa Brazilien yang merupakan kandungan *Caesalpinia sappan* L. pada dosis 5 mg/kg dosis 10 mg/kg per hari dengan mekanisme kerja dapat menghambat ekspresi PSD-95 pada

sumsum tulang belakang setelah cedera saraf skiatik. Ye *et al.*, 2005 juga melaporkan bahwa Brazilein pada ekstrak etanol dapat menghambat proliferasi sel limfosit T dan limfosit B yang distimulasi dan dapat menekan respon imunitas humoral pada hewan uji tikus. Selain itu, Wu *et al.*, 2008 melaporkan bahwa Protosappanin A di *C. sappan* L. telah menunjukkan aktivitas immunosupresif dalam penolakan akut pada allograft jantung tikus dengan mengukur rasio sel T CD4+ /CD8+.

B. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa aktif yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi banyak yang telah ditetapkan (Anonim, 2000).

Tujuan ekstraksi adalah untuk memisahkan senyawa dari campurannya atau simplisia dan juga untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat pada simplisia. Peranan ekstraksi dalam analisis fitokimia sangat penting, karena merupakan tahap awal dalam skrining senyawa aktif tanaman (Hanani, 2015). Proses terekstraksinya zat aktif

dalam sel adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel tanaman atau hewan yang mengandung zat aktif (osmosis). Zat aktif tersebut akan terlarut sehingga akan terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan larutan organik di luar sel sehingga larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (Anonim, 1986).

Pelarut polar akan menarik komponen polar sedangkan pelarut nonpolar akan menarik komponen nonpolar. Prinsip "*like dissolves like*" inilah yang digunakan dalam teknik ekstraksi. Metode ekstraksi terbagi atas dua yaitu metode ekstraksi dingin dan metode ekstraksi panas. Maserasi termasuk metode ekstraksi dingin (Anonim, 1986).

Metode ekstraksi berdasarkan suhu yaitu (Simanjuntak, 2008):

a. Cara dingin

1. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyarian sempurna yang umumnya dilakukan pada suhu kamar. Proses perkolasi terdiri atas tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat).

b. Cara panas

1. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Anonim, 2000).

2. Digesti

Digesti adalah maserasi dengan pengadukan kontinu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar yaitu pada 40 - 50°C.

3. Infusa

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90°C selama 15 menit. Infusa adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada temperatur penangas air dimana bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur yang digunakan (96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (Anonim, 2000).

4. Dekok

Dekok adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90°C selama 30 menit. Metode ini digunakan untuk ekstraksi konstituen yang larut dalam air dan konstituen yang labil terhadap panas (Tiwari *et al.*, 2011).

C. *Drosophila melanogaster*

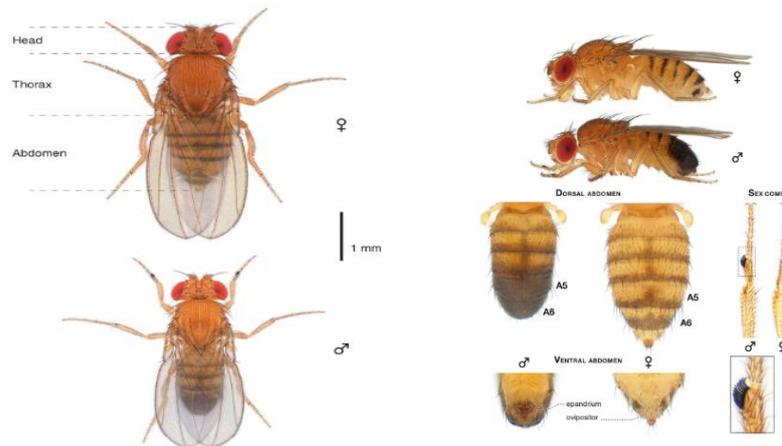
1. Deskripsi

Menurut kunci determinasi serangga *D. melanogaster* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Diptera
Famili	: Drosophilidae
Genus	: <i>Drosophila</i>
Spesies	: <i>Drosophila melanogaster</i>

D. melanogaster termasuk ke dalam jenis hewan tidak bertulang belakang (invertebrata) dan merupakan spesies pertama di dunia yang susunan genomnya dikarakterisasi (Adams *et.al.*, 2000). Setelah selesai sekuensing genom pada manusia beberapa tahun kemudian diketahui bahwa ada kesamaan antara genom *D. melanogaster* dengan manusia sehingga memperkuat peran *D. melanogaster* sebagai hewan model untuk mempelajari proses biologi dan penyakit manusia. Dalam 100 tahun terakhir, penelitian *D. melanogaster* telah menjadi hal yang sangat penting dalam analisis mekanisme molekuler. Sekitar 65% dari gen penyebab penyakit manusia diyakini memiliki fungsi yang homolog pada lalat dan bagian yang signifikan dari homolognya ini diekspresikan dalam jaringan *D. melanogaster* yang melakukan fungsi setara dengan jaringan manusia.

Selain itu, penemuan-penemuan yang terkait dengan genetik dan fungsi biologis sering ditemukan pertama kali pada lalat buah (*D. melanogaster*) dan kemudian diobservasi ke sistem mamalia.

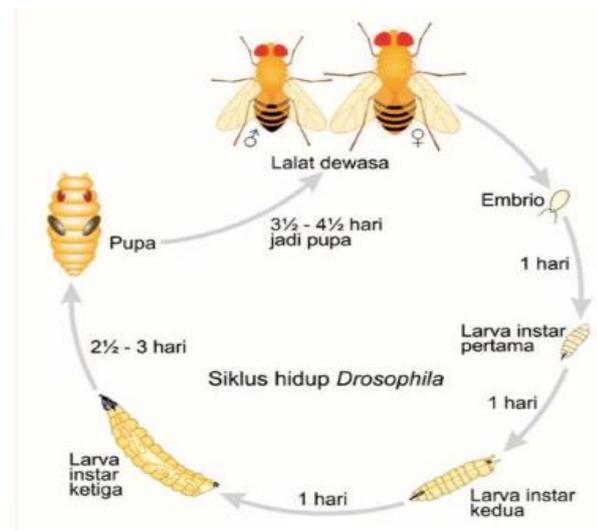


Gambar 3. Lalat buah *Drosophila melanogaster* (Chyb and Gompel, 2013)

2. Siklus hidup *Drosophila melanogaster*

Lalat-lalat betina yang telah dibuahi menyimpan sperma di dalam *receptaculum seminis* untuk fertilisasi dari ratusan telur yang akan dikeluarkan setelah beberapa hari. Pada suhu 25°C perkembangan embrionik berlangsung selama sekitar 21 jam. Larva yang ditetaskan (instar pertama) membutuhkan waktu selama 2 hari untuk mengelupas menjadi larva instar kedua yang selanjutnya menjadi larva instar ketiga. Larva instar ketiga akan terus makan selama satu hari sebelum larva tersebut meninggalkan sumber makanan mereka dan bermigrasi yang pada akhirnya membentuk prepupa lalu kemudian menjadi pupa. Selama stadium pupa, semua organ akan berdegenerasi dan dibentuk kembali

menjadi serangga dewasa (metemorfosis). Sekitar 10 hari setelah bertelur, lalat-lalat dewasa akan keluar dari selubung pupa. Lalat-lalat jantan muda yang baru saja keluar dari pupa membutuhkan waktu selama 8 jam untuk dewasa, sehingga hal ini memungkinkan dikumpulkannya lalat-lalat betina perawan (Roote and Prokof, 2013; Markow, 2015).



Gambar 4. Siklus hidup *Drosophila melanogaster* (Nainu, 2018).

3. *Drosophila melanogaster* Sebagai Hewan Uji

Drosophila melanogaster banyak digunakan sebagai model hewan untuk pengujian kandidat obat baru secara *in vivo*. Hal ini dikarenakan *D. melanogaster* memiliki siklus hidup singkat, sejumlah besar lalat dapat diperbanyak dengan cepat dan memiliki ukuran yang kecil sehingga ribuan lalat dapat hidup dalam kandang dengan ukuran yang sama dengan yang ditempati 10 ekor tikus. Selain itu, biaya pemeliharaan *D. melanogaster* cukup rendah dan tidak ada kekhawatiran etik untuk

digunakan dalam penelitian (Pandey and Nichols, 2011; Tzelepis *et al.*, 2013).

Drosophila melanogaster memiliki sejarah panjang sebagai organisme model untuk eksperimen genetika sebab memiliki kesamaan dengan manusia pada tingkat gen. *D. melanogaster* memiliki gen fungsional yang homolog sekitar 75% dan gen-gen tersebut umumnya berperan dalam patofisiologis penyakit yang berhubungan dengan gen manusia. Selain itu, genom *D. melanogaster* sepenuhnya telah disekuensing. Dengan demikian, banyak teknologi telah dikembangkan dengan teknik yang mudah dan yang umum digunakan seperti transgenesis, teknologi RNA *interference* (RNAi) dan microarray (Tzelepis *et al.*, 2013).

4. Rute Pemberian Obat pada *Drosophila melanogaster*

Ada beberapa rute pemberian obat yang dapat digunakan untuk *D. melanogaster* yaitu antara lain (Pandey and Nichols, 2011).

- a. Rute permeabilitas untuk *D. Melanogaster* diberikan dalam bentuk embrio.
- b. Untuk *D. melanogaster* yang masih dalam bentuk larva, obat ditambahkan ke dalam media tempat perkembangbiakan larva. Media tersebut dapat berupa media padat untuk pemaparan jangka panjang atau media ragi cair untuk pemaparan jangka pendek. Selain itu, obat juga dapat diinjeksikan langsung pada larva.

- c. Untuk *D. melanogaster* dewasa, terdapat 4 rute yaitu; 1) obat dibuat dalam bentuk gas atau aerosol misalnya etanol dan kokain, 2) obat dicampurkan ke dalam pakan *D. melanogaster* atau menggunakan kertas saring yang ditetesi obat. Bahan seperti sukrosa, pisang atau ragi perlu ditambahkan, jika obat yang digunakan memiliki rasa yang tidak enak, 3) obat diinjeksikan atau diberikan langsung pada bagian tubuh *D. melanogaster* yang sudah dibedah (*decapitation*), 4) obat diinjeksikan ke bagian abdomen sehingga dengan cepat dapat berdifusi ke dalam tubuh *D. melanogaster*.

D. Sistem Imun *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster hanya memiliki sistem imunitas alamiah (*innate immunity*). Imunitas alamiah yang ada pada *D. melanogaster* memiliki kemiripan yang sangat besar dengan manusia (Nainu, 2018). Pada tingkat seluler, *D. melanogaster* dilindungi oleh hemosit yang berupa plasmatosit, lamellosit, maupun sel-sel kristal (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Parsons and Foley, 2016). Ada tiga jalur sistem imun humoral pada *D. melanogaster* yang homolog dengan manusia yaitu *Toll*, *Imd* dan JAK-STAT (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Pada *D. melanogaster* reseptor *Toll* merupakan reseptor yang esensial dalam proses perkembangan embrionik dan imunitas lalat buah. Terdapat sembilan reseptor *Toll* yang dikode oleh genom *D. melanogaster* termasuk reseptor *Toll* pada *Toll pathway*. Induksi pada *Toll pathway* oleh bakteri Gram positif atau fungi akan mengakibatkan aktivasi imunitas seluler serta produksi beberapa peptida antimikroba seperti *Drosomycin*. Reseptor *Toll* mengalami aktivasi ketika ligan *Spaetzle* terikat pada reseptornya dan mengaktifkan faktor NF- κ B *Dorsal-related immunity factor* (Valenne, 2011).

Infeksi pada *D. melanogaster* akibat bakteri dan jamur akan mengaktifkan jalur *Toll* dan *IMD* yang berkontribusi pada resolusi infeksi. Jamur dan sebagian besar bakteri Gram-positif mengaktifkan jalur *Toll*, di mana kinase *Pelle* memfosforilasi protein I κ B *Cactus*, memicu poliubikuitinasi dan degradasinya oleh proteasom. Hal ini memungkinkan protein NF- κ B *DIF* dan *Dorsal* untuk berpindah ke nukleus dan

mengaktifkan transkripsi AMP seperti *Drosomycin*. Toll diaktifkan oleh *Spaetzle* sitokin mirip neurotropin. Molekul ini bersirkulasi di hemolimf sebagai prekursor tidak aktif dan diaktivasi oleh pemrosesan proteolitik. Kaskade proteolitik yang bekerja di bagian *upstream Spaetzle*, yang dipicu oleh pengenalan pola yang bersirkulasi reseptor (PRR) mensensor peptidoglikan tipe lisin (misalnya, PGRP-SA) atau β -glukan (misalnya, GGBP3), atau jalur dapat diinduksi oleh aktivitas proteolitik abnormal di hemolimf yang dirasakan oleh *persefone serine-protease* (Assel Mussabekova *et al.*, 2017).

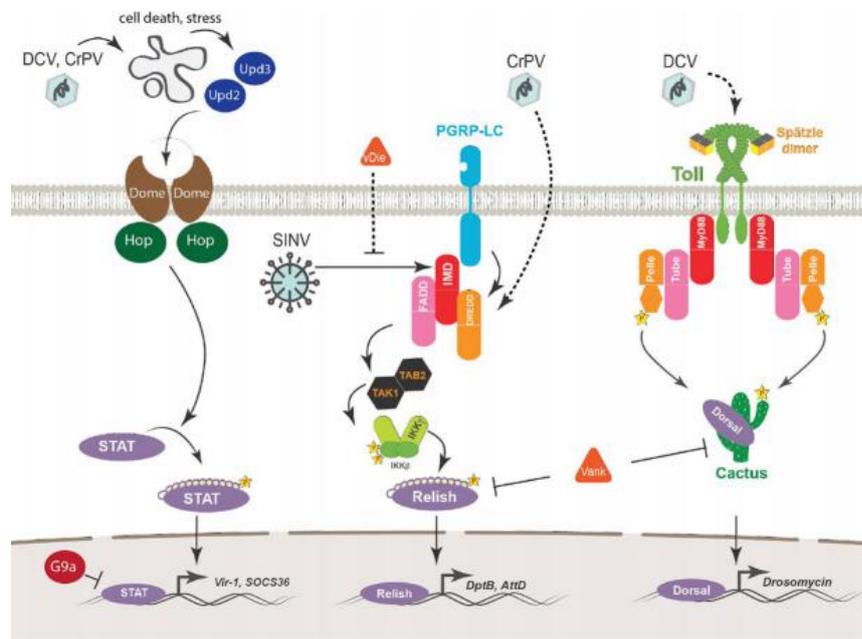
Jalur IMD merupakan salah satu jalur imunitas pada *D. melanogaster* yang berperan sangat penting dalam perlawanan terhadap bakteri. *Imd pathway* berfungsi untuk melawan bakteri Gram negatif. Jalur *Imd* teraktivasi oleh tipe peptidoglikan DAP (*meso-diaminopimelic acid*) yang umumnya terdapat pada dinding sel bakteri Gram *negative*. Terdapat dua reseptor penting yang berperan pada jalur *Imd*, PGRP-LC pada membrane plasma dan PGRP-LE terdapat pada bagian intraseluler (Kleino, 2015).

Bakteri gram negatif mengaktifkan jalur IMD melalui komponen dinding selnya. Secara khusus, asam di-aminopimelic disensor oleh transmembran PRR, PGRP-LC yang mengaktifkan sitoplasma. Jalur pensinyalan akan mengarah ke fosforilasi dan aktivasi protein NF- κ B lain yang disebut Relish. Setelah translokasi inti, Relish mentranskripsi gen peptida antimikroba (misalnya, Diptericin). Jalur Tol dan IMD memiliki

beberapa kesamaan dengan jalur inflamasi yang diatur oleh reseptor mirip Toll, reseptor interleukin-1, dan reseptor TNF pada mamalia (Mussabekova *et al.*, 2017).

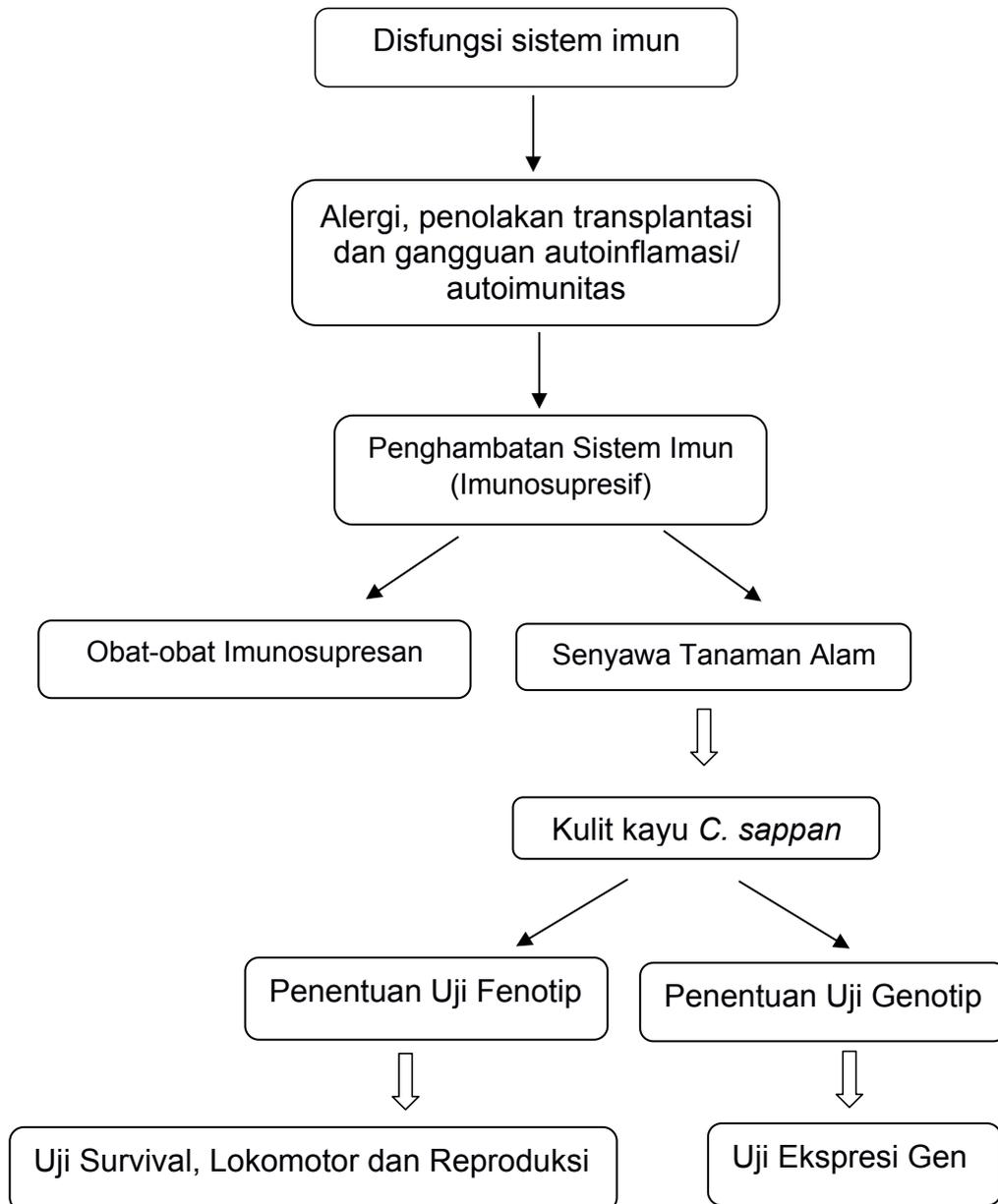
JAK-STAT merupakan jalur signal yang pertama diidentifikasi di mamalia karena memiliki peran dalam hal sitokin dan faktor pertumbuhan. Dalam hal regulasi sistem imun, salah satu contohnya yaitu JAK/STAT memiliki hubungan dengan beberapa aspek dari sistem imun termasuk dalam mengontrol respon inflamasi dan penyembuhan luka maupun pada aktivasi neutrofil dan makrofag. Jalur signal ini juga terdapat pada mamalia yang aktif jika diinduksi oleh sitokin (Ramet and Myllymaki, 2014).

Aktivasi jalur Jak/STAT memberikan ciri khas lain dari respons terhadap cedera septik di *Drosophila*. Genom *Drosophila* mengkodekan satu JAK kinase (Hopscotch) dan faktor transkripsi STAT tunggal (STAT92E), yang merespon aktivasi reseptor sitokin mirip gp130 Domeless oleh tiga sitokin dari keluarga Unpaired (Upd). Seperti pada gambar 2, dimana jalur Toll, IMD dan Jak/STAT telah diusulkan untuk memainkan peran dalam kekebalan antivirus (Assel Mussabekova *et al.*, 2017).



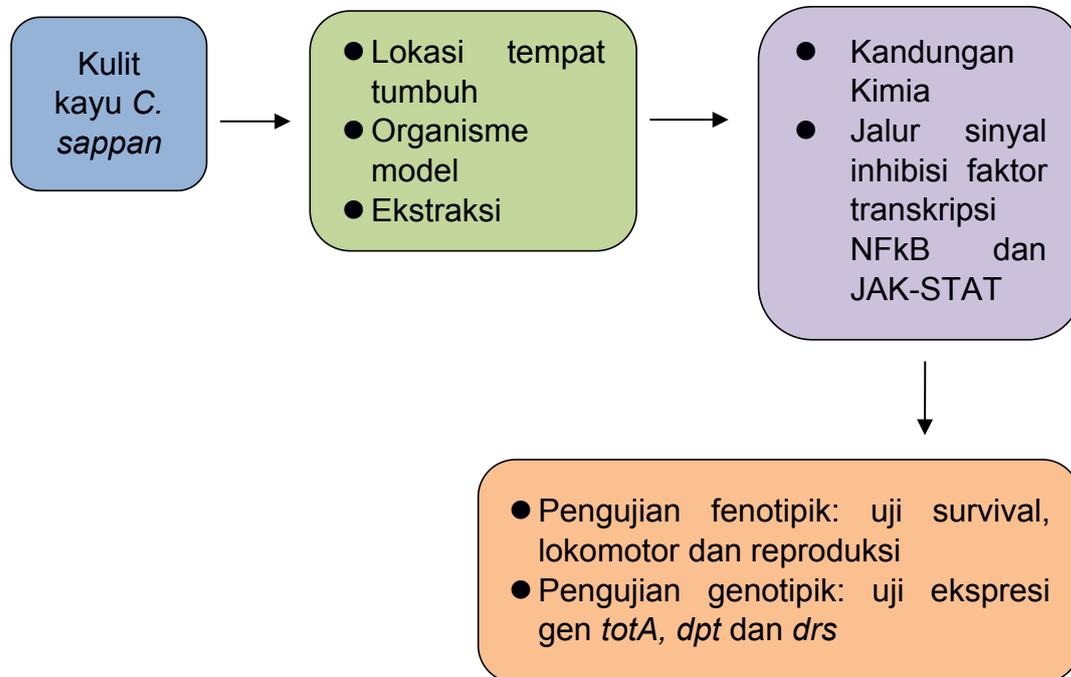
Gambar 2. Jalur Toll, IMD dan Jak/STAT memainkan peran dalam pertahanan antivirus (Assel Mussabekova *et al.* 2017)

E. Kerangka Teori

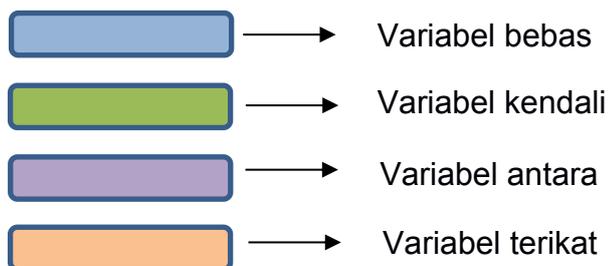


Gambar 5. Kerangka teori

F. Kerangka Konsep



Keterangan:



Gambar 6. Kerangka konsep