

**UJI AKTIFITAS BIOLOGIS FRAKSI ETHANOL DAUN
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) TERHADAP
PERUBAHAN KUANTITATIF SEL T DAN SEL B PADA
MENCIT *BALB/C* (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

oleh
UWAI AL QARNI
0910911005



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

**UJI AKTIFITAS BIOLOGIS FRAKSI ETHANOL DAUN
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) TERHADAP
PERUBAHAN KUANTITATIF SEL T DAN SEL B PADA
MENCIT *BALB/C* (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

oleh
UWAIS AL QARNI
0910911005



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI AKTIFITAS BIOLOGIS FRAKSI ETHANOL DAUN
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) TERHADAP
PERUBAHAN KUANTITATIF SEL T DAN SEL B PADA
MENCIT *BALB/C* (*Mus musculus*)**

oleh
Uwais Al Qarni
0910911005

Pembimbing

Muhaimin Rifa'i, S.Si., PhD., Med.Sc.
NIP. 196806261997021001

Menyetujui,
Ketua Program Studi S1 Jurusan Biologi

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M.Agr.Sc., Ph.D.
NIP. 197001281994122001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Uwais Al Qarni

NIM : 0910911005

Jurusan : Biologi

Judul Skripsi : Uji Aktifitas Biologis Fraksi *Ethanol* Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Terhadap Perubahan Kuantitatif Sel T dan Sel B Pada Mencit *BALB/c* (*Mus musculus*)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-maya digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila di kemudia hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran

Malang,
Yang menyatakan

Uwais Al Qarni
0910911005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Uji Aktifitas Biologis Fraksi *Ethanol* Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Terhadap Perubahan Kuantitatif Sel T dan Sel B Pada Mencit *BALB/c* (*Mus musculus*)

Uwais Al Qarni, Muhaimin Rifa'i
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Andrografolid merupakan senyawa aktif sejenis flavonoid yang terkandung dalam daun sambiloto dan berperan sebagai imunostimulan di dalam sistem imun. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perubahan kuantitatif sel T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD62L^+$, $CD8^+CD62L^+$, $CD4^+CD25^+$, sel B B220 dan Gr1 setelah pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto secara oral, mengetahui dosis optimum fraksi *ethanol* daun sambiloto dalam peningkatan sel imunokompeten, dan mengetahui histopatologis jaringan hepar setelah pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto. Metode yang digunakan adalah ekstraksi daun sambiloto dengan pelarut *ethanol* 95%. Perlakuan oral pada mencit *BALB/c* normal selama 2 minggu dengan dosis 0; 0,1; 0,5; dan 1 mg/g BB. Isolasi sel limfosit organ *spleen* dan dilakukan analisis kuantitatif sel limfosit menggunakan *haemocytometer* dan *flowcytometry*. Pembuatan preparat histologi hepar dengan pewarnaan HE. Analisis data kuantitatif sel limfosit menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji ANOVA selang kepercayaan 95% dan uji Tukey HSD menggunakan program SPSS 16 for Windows. Pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto secara oral mampu meningkatkan jumlah sel T $CD8^+$, $CD4^+CD25^+$, sel B220⁺, dan Gr-1 pada Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dan Dosis 2 (0,5 mg/g BB) namun tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol, sedangkan penurunan jumlah sel T $CD4^+$, $CD4^+CD62L^+$, dan $CD8^+CD62L^+$ pada Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dan Dosis 3 (1 mg/g BB) namun tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol. Dosis optimum fraksi *ethanol* daun sambiloto dalam peningkatan sel imunokompeten adalah 0,1 mg/g BB. Fraksi *ethanol* daun sambiloto dosis 1 mg/g BB menimbulkan efek toksik pada jaringan hepar.

Kata kunci: andrografolid, daun sambiloto, fraksi *ethanol*, histopatologi, imunostimulan

**Biological Activity of Fraction Ethanol Leaves *Paniculata*
(*Andrographis paniculata*) Against Quantitative Changes T Cells
and B Cells in Mice BALB /c (*Mus musculus*)**

Uwais Al Qarni, Muhaimin Rifa'i

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

Andrographolide is a type of flavonoid active compounds contained in bitter leaf and serve as an immunostimulant in the immune system. The purpose of this study was to determine the quantitative changes of T cells CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺ CD62L⁺, CD8⁺ CD62L⁺, CD4⁺ CD25⁺ B cells B220 and Gr1 after administration fraction ethanol bitter leaf orally, determine the optimum dose fraction ethanol bitter leaf in an increase in cell immunocompetent, and knowing histopathologic liver tissue after administration of ethanol fraction bitter leaf. The method used is the extraction of bitter leaf with 95% ethanol solvent. Oral treatment in BALB / c mice to normal for 2 weeks at a dose of 0, 0.1, 0.5, and 1 mg / g BW. Isolation of spleen lymphocytes organ and performed quantitative analysis of lymphocyte cells using haemocytometer and flowcytometry. Making preparations liver histology with HE staining. Quantitative data analysis lymphocyte cells using completely randomized design (CRD) with ANOVA and 95% confidence interval of the Tukey HSD test using SPSS 16 for Windows. Provision of bitter leaf fraction ethanol orally to increase not significant CD8⁺ T cell count, CD4⁺ CD25⁺, B220⁺ cells, and Gr-1 at doses of 1 (0.1 mg / g BW) and dose 2 (0.5 mg / g BW), whereas no significant decrease in the number of CD4⁺ T cells, CD4⁺ CD62L⁺ and CD8⁺ CD62L⁺ in 1 dose (0.1 mg / g BW) and dose 3 (1 mg / g BW). The optimum dose of bitter leaf fraction of ethanol in increasing immunocompetent cells was 0.1 mg / g BW. Fraction of bitter leaf ethanol dose of 1 mg / g BW cause toxic effects on the liver tissue.

Keywords: Andrographolide, bitter leaf, ethanol fractions, histopathology, immunostimulant

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi sebagai salah satu persyaratan untuk meraih gelar Sarjana S1 di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Dengan segala hormat dan kerendahan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Bapak **Muhaimin Rifa'i S.Si, Ph.D, Med.Sc.** sebagai Dosen Pembimbing, atas bimbingan, kesabaran, dedikasi dan motivasinya kepada penulis.
2. Bapak **Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS.** sebagai Penguji, atas berbagai saran dan nasihat yang mendukung penelitian penulis.
3. Bapak **Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS** dan Bapak **Muhaimin Rifa'i S.Si, Ph.D, Med.Sc.** selaku Penasihat Akademik, atas bimbingan, strategi dan pelajaran untuk mengambil keputusan selama masa perkuliahan dan menempuh skripsi.
4. Pak **Harmaji**, Mbak **Dewi S.Si.**, Mbak **Khoirin S.Si.**, Mas **Sony S.Si.**, **Bambang, Arief, Yuyun, Indri, Dini, Yonna, Lia, Aden, Churi, Qonita** dan **Jannah** atas bantuan dan saran selama pengerjaan penelitian skripsi.
5. Bapak **Machfoet Effendi**, Ibu **Retno Dewi**, dan seluruh keluarga besar penulis atas dukungan, motivasi, doa, dan semangat hidup selama menempuh studi perkuliahan hingga skripsi.
6. **Miggy, Bambang, Bunga, Hardi, Ridho, Chandra, Sultan, Deasy, Putri, Cholil, Lulus, Fara, Erma, Fevi, Linda, Yustino, Evi** dan seluruh sahabat **Biologi 2009** atas seluruh dukungan, semangat, dan berbagi suka duka selama menempuh perkuliahan dan skripsi.

Penulis menyadari skripsi ini masih jauh sempurna, oleh karena itu penulis sangat menghargai saran dan kritik mengenai skripsi ini sebagai penyempurnaan di masa mendatang. Penulis berharap skripsi ini bermanfaat sebagai sarana untuk mencerdaskan bangsa.

Malang, 22 Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	<u>Halaman</u>
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	iv
DAFTAR SINGKATAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sistem Imun	4
2.2 Organ Spleen	7
2.3 Sel Limfosit	8
2.4 Perkembangan Sel Limfosit.....	12
2.5 Tanaman Sambiloto	13
2.6 Histopatologi Hepar.....	18
2.7 Flowcytometry.....	19
BAB III METODE PENELITIAN	21
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.2 Prosedur Penelitian	21
3.2.1 Deskripsi Hewan Coba	21
3.2.2 Perlakuan Hewan Coba	21
3.2.3 Preparasi Sampel Ekstrak Ethanol Daun Sambiloto.....	21
3.2.4 Isolasi Sel Limfosit dari Organ Spleen.....	22
3.2.5 Penghitungan Sel Limfosit Menggunakan Haemocytometer ...	22
3.2.6 Analisis Kuantitatif Sel T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ CD62L ⁺ , CD4 ⁺ CD62L ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ , dan Sel B B220 Menggunakan Flowcytometry.....	23
3.2.7 Preparat Histologi Hepar	23

3.2.8 Analisis Data	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Analisis Jumlah Total Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺	25
4.2. Analisis Jumlah Total Sel CD4 ⁺ CD62L ⁺ dan CD8 ⁺ CD62L ⁺	29
4.3. Analisis Jumlah Total Sel CD4 ⁺ CD25 ⁺	33
4.4. Analisis Jumlah Total Sel B220 ⁺	36
4.4. Analisis Jumlah Total Sel Gr-1	38
4.5. Analisis Perubahan Sel Hepar	40
BAB V PENUTUP	43
5.1. Kesimpulan.....	43
5.2. Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	48



DAFTAR GAMBAR

<u>Nomor</u>	<u>Halaman</u>
1. Perkembangan sel imun.....	6
2. Diferensiasi sel limfosit.....	7
3. Anatomi spleen.....	8
4. Respon imun.....	10
5. Tanaman sambiloto.....	14
6. Struktur kimia senyawa aktif sambiloto.....	16
7. Skema kerja Flowcytometry.....	20
8. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ hasil analisis flowcytometry pada organ spleen.....	25
9. Jumlah relatif sel T CD4 ⁺ pada organ spleen perlakuan oral selama 2 minggu.....	26
10. Jumlah relatif sel T CD8 ⁺ pada organ spleen perlakuan oral selama 2 minggu.....	28
11. Jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ pada organ spleen perlakuan oral selama 2 minggu.....	29
12. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ hasil analisis flowcytometry pada organ spleen.....	30
13. Profil persentase jumlah relatif sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ hasil analisis flowcytometry pada organ spleen.....	31
14. Jumlah relatif sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada organ spleen perlakuan oral selama 2 minggu.....	32
15. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺ hasil analisis flowcytometry pada organ spleen.....	34
16. Jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺ pada organ spleen perlakuan oral selama 2 minggu.....	35
17. Profil persentase jumlah relatif sel B B220 dan Gr-1 hasil analisis flowcytometry pada organ spleen.....	36
18. Jumlah relatif sel B B220 pada organ spleen perlakuan oral Selama 2 minggu.....	37
19. Jumlah relatif Gr-1 pada organ spleen perlakuan oral selama 2 minggu.....	39
20. Struktur histologi hepar.....	40
21. Tahapan kerusakan sel hepar.....	41
22. Persentase perubahan sel hepar perlakuan oral selama 2 minggu.....	42
23. Berat badan mencit.....	58

24. Jumlah absolut sel T CD4 ⁺ pada organ <i>spleen</i> perlakuan oral selama 2 minggu.....	61
25. Jumlah absolut sel T CD8 ⁺ pada organ <i>spleen</i> perlakuan oral selama 2 minggu.....	61
26. Jumlah absolut sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ pada organ <i>spleen</i> perlakuan oral selama 2 minggu.....	63
27. Jumlah absolut sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada organ <i>spleen</i> perlakuan oral selama 2 minggu.....	65
28. Jumlah absolut sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺ pada organ <i>spleen</i> perlakuan oral selama 2 minggu.....	66
29. Jumlah absolut sel B B220 pada organ <i>spleen</i> perlakuan oral selama 2 minggu.....	68
30. Jumlah absolut Gr-1 pada organ <i>spleen</i> perlakuan oral selama 2 minggu.....	69



DAFTAR TABEL

<u>Nomor</u>	<u>Halaman</u>
1. Kelompok Perlakuan	21
2. Penghitungan dosis	56
3. Hasil perhitungan sel menggunakan Haemocytometer	59
4. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺	60
5. Hasil uji ANOVA jumlah absolut sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺	60
6. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺	62
7. Hasil uji Tukey jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺	62
8. Hasil uji ANOVA jumlah absolut sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺	63
9. Hasil Uji ANOVA jumlah relatif Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	64
10. Hasil Uji ANOVA jumlah absolut Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	64
11. Hasil uji ANOVA jumlah relatif Sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺	65
12. Hasil uji ANOVA jumlah absolut sel T CD4 ⁺ CD25 ⁺	66
13. Hasil uji ANOVA jumlah relatif B220 ⁺	67
14. Hasil uji ANOVA jumlah absolut B220 ⁺	67
24. Hasil uji ANOVA jumlah relatif Gr-1	68
26. Hasil uji ANOVA jumlah absolut Gr-1	69
28. Hasil uji ANOVA perubahan sel hepar	70
29. Hasil uji Tukey perubahan sel hepar	70

DAFTAR LAMPIRAN

<u>Nomor</u>	<u>Halaman</u>
1. Sertifikat Laik Etik	48
2. Kerangka Konsep	49
3. Kerangka Operasional	50
4. Pembuatan Fraksi Ethanol Daun Sambiloto	51
5. Isolasi <i>Spleen</i> dan Penghitungan Sel	52
6. Analisa Flowcytometry	53
7. Pembuatan Preparat Hepar Pewarnaan HE	54
8. Penghitungan Dosis Sonde	56
9. Berat Badan Mencit Perlakuan	58
10. Hasil Perhitungan Haemocymeter	59
11. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	60
12. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	60
13. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif CD4 ⁺ CD62L ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	62
14. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD4 ⁺ CD62L ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	63
15. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif CD8 ⁺ CD62L ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	64
16. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD8 ⁺ CD62L ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	64
17. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif Sel CD4 ⁺ CD25 ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	65
18. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD4 ⁺ CD25 ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	66
19. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif B220 ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	67
20. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut B220 ⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows	67
21. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif Gr1 Melalui Software SPSS 16 for Windows	68
22. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut Gr1 Melalui Software SPSS 16 for Windows	69
23. Hasil Analisis Statistika Perubahan Sel Hepar Melalui Software SPSS 16 for Windows	70

DAFTAR ISTILAH

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ACTH	Adrenokortikotropik
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
APCn	Allophycocyanin
BB	Berat badan
BRM	<i>Biological Response Modifiers</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Foxp3	<i>Forkhead P3</i>
Gr-1	<i>Granulocyte differentiation antigen 1</i>
HE	Hematoksilen Eosin
HSD	<i>High Significant</i>
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
MDP	Muramil dipeptida
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PALS	<i>Pariarteriolar Lymphoid Sheaths</i>
PBS	Posphat Buffer Saline
PE	Phycoerythrin
RAL	Rancangan Acak Lengkap
Tc	T cytotoxic
TCR	T-cell antigen reseptor
Th	T helper
Treg	T regulator
Ts	T supresor

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sistem imun memiliki peran untuk mempertahankan kekebalan tubuh dari serangan zat asing terutama yang bersifat antigen. Imunomodulator merupakan sistem yang dapat mempengaruhi sistem imun. Imunomodulator memiliki sistem kerja sebagai imunostimulan yang bekerja untuk merangsang penguatan sistem imun atau sebagai immunosupresan yang bekerja untuk menekan respon imun yang berlebih sehingga daya tahan tubuh tetap optimal untuk menjaga kesehatan tubuh dari berbagai serangan berbagai antigen seperti virus, bakteri maupun mikroorganisme lainnya.

Imunomodulator adalah substansi yang dapat memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun. Imunomodulator dibagi menjadi tiga kelompok: i) imunostimulator, berfungsi untuk meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun, ii) immunoregulator, artinya dapat meregulasi sistem imun, dan iii) immunosupresor yang dapat menghambat atau menekan aktivitas sistem imun. Kebanyakan tanaman obat yang telah diteliti membuktikan adanya kerja imunostimulator, sedangkan untuk immunosupresor masih jarang dijumpai. Pemakaian tanaman obat sebagai imunostimulator dengan maksud menekan atau mengurangi infeksi virus dan bakteri intraseluler, untuk mengatasi immunodefisiensi atau sebagai perangsang pertumbuhan sel-sel pertahanan tubuh dalam sistem imunitas (Block dan Mead, 2003). Bahan yang dapat menstimulasi sistem imun disebut biological response modifiers (BRM), dibagi menjadi dua kelompok yaitu bahan biologis dan sintetik. Yang termasuk bahan biologis diantaranya adalah sitokin (interferon), hormon timus dan antibodi monoklonal, sedangkan bahan sintetik antara lain adalah senyawa muramil dipeptida (MDP) dan levamisol (Tizard, 2000).

Tanaman berkasiat obat yang cukup menarik untuk diteliti yaitu tanaman Sambiloto. Sambiloto bukan tumbuhan asli Indonesia, diduga berasal dari India. Tanaman ini memiliki rasa yang sangat pahit sehingga banyak yang menyebutnya “*King of Bitter*” atau “Si Raja Pahit”. Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) merupakan tanaman yang sering digunakan untuk obat. Senyawa aktif yang dimanfaatkan adalah senyawa bernama andrografolid, dimana senyawa ini berperan sebagai immunomodulator khususnya imunostimulan yang mampu meningkatkan kerja sistem imun. Di India, sambiloto adalah tumbuhan

liar yang digunakan untuk mengobati penyakit diare dan malaria. Kandungan andrografolid didalamnya mampu meningkatkan fungsi sistem pertahanan tubuh seperti sel darah putih untuk menyerang bakteri dan benda asing lainnya (imunomodulator), flavonoid sebagai antiinflamasi, dan tanin sebagai antidiare (Sumaryono, 2002).

Oleh karena itu, diperlukan alternatif lain yaitu dengan memanfaatkan tanaman tradisional yang termasuk dalam kelompok imunomodulator. Obat nabati melalui ekspresi sitokin dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan atau sistem imunitas tubuh yang meliputi sistem imunitas spesifik dan nonspesifik (Spelman et al., 2006). Indonesia memiliki keanekaragaman hayati nomor dua di dunia setelah Brasil dengan ribuan spesies tumbuhan yang tersebar di hutan tropika (Hakim, 2002). Berbagai komponen bioaktif yang terdapat di dalam tumbuhan dan bermanfaat bagi kesehatan telah dikembangkan sebagai obat sintesis atau masih digunakan dalam bentuk ramuan beberapa simplisia tumbuhan yang dikenal dengan istilah jamu (Sumaryono, 2002). Penelitian tentang pemanfaatan tanaman tradisional sebagai imunomodulator berkaitan dengan ekspresi sitokinnya telah banyak dilakukan (Spelman et al., 2006). Pada penelitian ini akan diuji tentang peranan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai imunostimulan maupun immunosupresan dan mekanismenya dalam memodulasi sistem imun secara sitotoksitas seluler yang merupakan sistem mekanisme pertahanan yang sangat penting dalam melawan antigen.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang ada pada penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana perubahan kuantitatif sel T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD62L^+$, $CD8^+CD62L^+$, $CD4^+CD25^+$, sel B B220 dan Gr-1 pada organ *spleen* setelah pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto secara oral?
2. Berapa dosis optimum fraksi *ethanol* daun sambiloto dalam peningkatan sel – sel limfosit pada mencit BALB/c?
3. Bagaimana histopatologis jaringan hepar setelah pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto?

1.3 Tujuan

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui perubahan kuantitatif sel T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD62L^+$, $CD8^+CD62L^+$, $CD4^+CD25^+$, sel B B220 dan Gr1 pada organ *spleen* setelah pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto secara oral.
2. Mengetahui dosis optimum fraksi *ethanol* daun sambiloto dalam peningkatan sel – sel limfosit pada mencit BALB/c.
3. Mengetahui histopatologis jaringan hepar setelah pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini bisa digunakan sebagai dasar pengobatan alternatif dari senyawa aktif suatu tanaman yang bersifat farmakologis untuk memperkuat sistem imun secara alami sehingga bisa mencegah gangguan sistem imun.



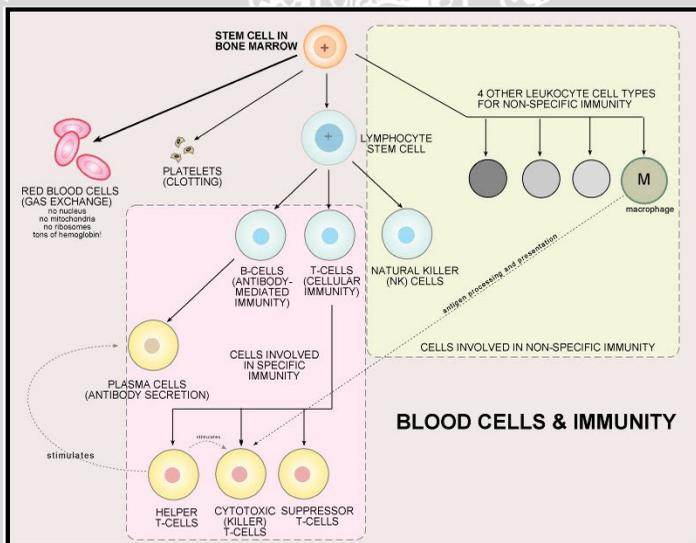
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistem Imun

Sistem imun atau sistem kekebalan tubuh merupakan sistem interaktif kelompok dari berbagai jenis sel imunokompeten yang bekerja sama dalam proses identifikasi dan eliminasi mikroba patogen dan zat-zat asing yang berbahaya lainnya yang masuk ke dalam tubuh (Paul, 2008). Sistem kekebalan adalah sistem perlindungan tubuh terhadap pengaruh luar biologis yang dilakukan oleh sel dan organ khusus pada suatu organisme. Tidak jauh berbeda dengan kesimpulan Weissman *et al.*, (1978) yang menyatakan bahwa definisi sistem imun ialah sistem pertahanan yang dimiliki oleh vertebrata yang bertugas untuk melindungi tubuh dari mikroorganisme penyebab penyakit, seperti bakteri, virus, bahkan sel kanker. Jika sistem kekebalan bekerja dengan benar, sistem ini akan melindungi tubuh terhadap infeksi bakteri, virus, maupun cacing parasit dengan cara mendeteksi kemudian menghancurkannya, termasuk memusnahkan sel kanker dan zat asing lain dalam tubuh. Keberadaan sel imun tersebut akan senantiasa menjaga sel, jaringan, ataupun organ tubuh agar dapat berfungsi secara normal. Sebaliknya apabila sistem kekebalan melemah maka kemampuannya melindungi tubuh juga berkurang, sehingga akan menyebabkan mikroba patogen, termasuk virus dapat berkembang dalam tubuh.

Sistem kekebalan juga memberikan pengawasan terhadap sel tumor, dan terhambatnya sistem ini juga dilaporkan dapat meningkatkan resiko terkena beberapa jenis kanker. Suatu cara yang dilakukan oleh tubuh berupa respon atau reaksi yang timbul akibat adanya zat asing atau patogen tertentu yang masuk ke dalam tubuh dikenal dengan sebutan respon imun. Respon tersebut meliputi produksi sel-sel imun atau zat kimia yang berfungsi untuk mempertahankan tubuh melawan patogen. Semakin baik respon imun tubuh maka semakin baik pula status kesehatan seseorang. Ketika antigen memasuki tubuh akan terjadi dua macam reaksi respon imun yang berbeda, yaitu respon imun spesifik dan nonspesifik. Respon imun nonspesifik umumnya dikenal sebagai respon imun alamiah atau bawaan (*innate immunity*) yang merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan mikroba atau zat-zat asing. Beberapa contoh respon imun nonspesifik, antara lain proses fagositosis oleh sel neutrofil dan monosit, barrier kimia melalui

sekresi internal dan eksternal (lisozim dalam mukus jaringan, air mata, dan laktoperoksidase dalam kelenjar ludah), produksi protein darah (interferon, sistem kinin, dan komplemen), serta aktivitas sel natural killer (NK). Respon imun tersebut disebut sebagai respon nonspesifik karena respon atau reaksi yang timbul tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu dan bersifat efektif untuk semua jenis mikroba (Sompayrac, 2003). Sedangkan respon imun spesifik merupakan respon imun yang didapat (*adaptive immunity*) yang timbul terhadap antigen tertentu, di mana tubuh pernah terpapar antigen tersebut sebelumnya. Benda asing yang masuk pertama kali ke dalam tubuh akan segera dikenali oleh sistem imun ini sehingga terjadi sensitivitas sel-sel imun spesifik dan jika berpapasan kembali dengan benda asing yang sama atau mirip, benda asing ini akan dikenali lebih cepat kemudian akan segera dihancurkan.



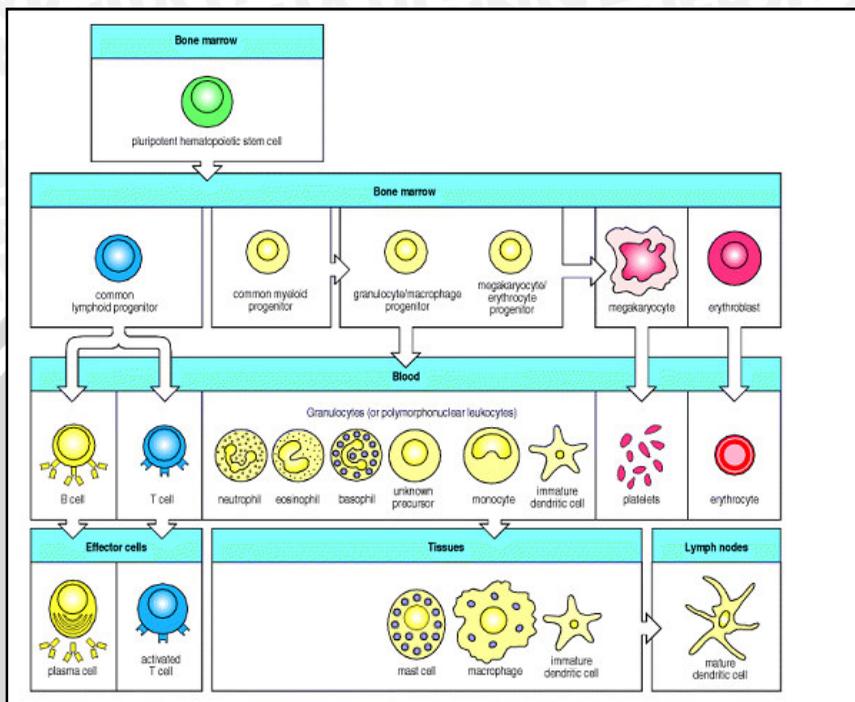
Sumber: Sompayrac, 2003

Gambar 1. Perkembangan sel imun

Menurut Weissman *et al.*, (1978), respon imun spesifik timbul dari dua sistem berbeda yang saling bekerja sama, yaitu respon imun seluler (limfositik) dan humoral (berkaitan dengan antibodi di dalam darah). Respon imun seluler memberikan pertahanan terhadap mikroba intraseluler dan estraseluler melalui sekresi limfokin, seperti interferon

dan interleukin, sedangkan respon imun humoral memberi pertahanan melalui produksi antibodi terhadap antigen spesifik. Respon imun spesifik dan nonspesifik selain dibedakan berdasarkan spesifitasnya, dipengaruhi juga oleh heterogenitas dan kemampuan sistem memori imun terhadap antigen tertentu. Kedua jenis respon tersebut saling meningkatkan efektivitas serta interaksi keduanya menghasilkan aktivitas biologik yang serasi dan berbagai mekanisme di antara keduanya tidak dapat dipisahkan.

Menurut Eurell (2004), di dalam tubuh manusia terdapat tiga jenis sel darah, yaitu sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit) dan keping darah (trombosit). Sel darah merah menyusun sedikitnya 45% dari total volume darah, sedangkan sel darah putih yang tersusun atas neutrofil, basofil, eosinofil, limfosit, dan monosit menyusun kurang dari 1% dari seluruh total volume darah. Sel darah putih terbagi atas dua kelompok, yaitu granulosit yang memiliki butir khas dan jelas dalam sitoplasma dan agranulosit yang tidak memiliki butir khas dalam sitoplasma. Komposisi sel darah putih terdiri dari 75% sel granulosit dan 25% agranulosit yang terbentuk dari dalam sumsum tulang belakang (Rhoades dan Bell, 2009). Sel limfosit dan monosit termasuk dalam kelompok agranulosit, sedangkan basofil, neutrofil dan eosinofil termasuk dalam kelompok granulosit. Komponen seluler darah yang utama adalah monosit dan limfosit. Limfosit merupakan salah satu bagian dari sel darah putih yang bersifat agranulosit (tidak memiliki granula). Secara umum ukuran dan penampilan limfosit bervariasi, serta memiliki inti sel yang relatif lebih besar yang dikelilingi oleh sejumlah sitoplasma. Sel ini berbentuk bulat, dan berukuran kecil dengan diameter sel 7-20 μm . Limfosit dibentuk di kelenjar timus dan sumsum merah tulang umumnya banyak terdapat pada pembuluh darah dan organ limfoid, seperti limfa, kelenjar limfe, dan timus (Kimball, 1990).



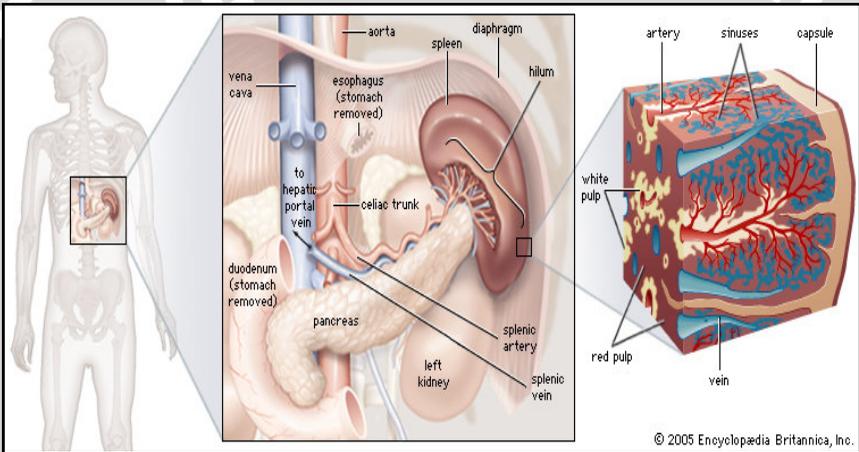
Sumber: Murphy, 2008

Gambar 2. Diferensiasi sel limfosit

2.2 Organ Spleen

Spleen adalah kelenjar tanpa saluran (*ductless*) yang berhubungan erat dengan sistem sirkulasi dan berfungsi menghancurkan sel darah merah tua. *Spleen* termasuk salah satu organ sistem limfoid, selain timus, tonsil, dan kelenjar limfe. Sistem limfoid berfungsi untuk melindungi tubuh dari kerusakan akibat zat asing. Sel-sel pada sistem ini dikenal dengan sel imunokompeten yaitu sel yang mampu membedakan sel tubuh dengan zat asing dan menyelenggarakan inaktivasi atau perusakan benda-benda asing. Sel imunokompeten terdiri atas sel limfosit, makrofaga, retikuloendotel, dan sel plasma. *Spleen* merupakan organ limfoid terbesar dan terletak di bagian depan dan dekat punggung rongga perut di antara diafragma dan lambung. Secara anatomis, tepi *spleen* yang normal berbentuk pipih. Fungsi *spleen* yaitu mengakumulasi limfosit dan makrofaga, degradasi eritrosit, tempat cadangan darah, dan sebagai organ pertahanan terhadap infeksi partikel asing yang masuk ke dalam darah. *Spleen* dibungkus oleh kapsula, yang

terdiri atas dua lapisan, yaitu satu lapisan jaringan penyokong yang tebal dan satu lapisan otot halus. Perpanjangan kapsula ke dalam parenkim *spleen* disebut trabekula. Trabekula mengandung arteri, vena, saraf, dan pembuluh limfe. Parenkim *spleen* disebut pulpa yang terdiri atas pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah berwarna merah gelap pada potongan *spleen* segar. Pulpa merah terdiri atas sinusoid *spleen*. Pulpa putih tersebar dalam pulpa merah, berbentuk oval dan berwarna putih kelabu. Pulpa putih terdiri atas pararteriolar limphoid sheats (PALS), folikel limfoid, dan zona marginal. Folikel limfoid umumnya tersusun atas sel limfosit B, makrofag, dan sel debris (Krall, 1992)



Sumber: Krall, 1992

Gambar 3. Anatomi *spleen*

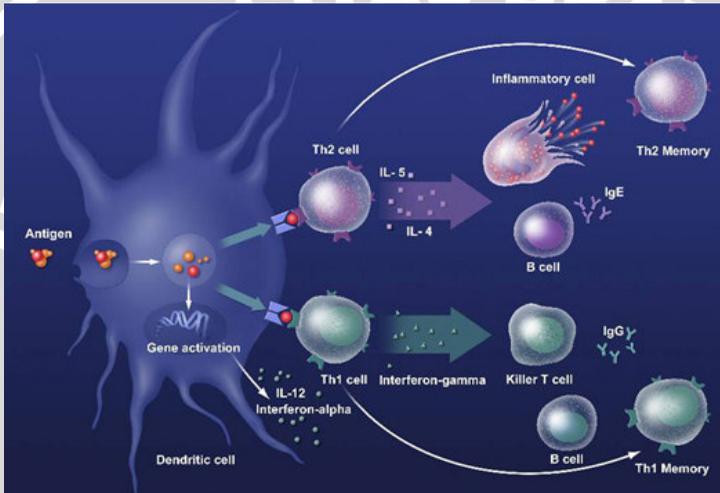
2.3 Sel Limfosit

Limfosit adalah sel yang berfungsi dalam respon imun yang dibentuk melalui jalur limfoid. Sel limfosit memiliki peranan penting dalam proses respon imun spesifik karena sel-sel limfosit dapat mengenal setiap jenis antigen, baik antigen intraseluler maupun ekstraseluler, seperti antigen di dalam darah atau di dalam cairan tubuh lainnya. Fungsi utama limfosit adalah memberikan respon terhadap antigen (benda-benda asing) dengan membentuk antibodi yang bersirkulasi di dalam darah atau dalam pengembangan imunitas seluler (Paul, 2008). Guyton dan Hall (2006) mengatakan bahwa limfosit manusia berjumlah sekitar 30% dari jumlah normal sel darah putih. Limfosit dapat membentuk ratusan jenis antibodi dan limfosit sensitif yang berbeda-beda. Masing-

masing jenis sifatnya spesifik untuk suatu antigen yang khusus dan tiap jenisnya dapat menggandakan diri mencapai jumlah yang sangat besar (kultur sel) apabila distimulasi oleh antigen spesifik yang jumlahnya cukup. Limfosit dibentuk di dalam sumsum tulang belakang dan berdiferensiasi menjadi sel limfosit T dan limfosit B. Secara umum limfosit dapat dibagi menjadi tiga kelompok utama, yaitu sel B, sel T, dan sel natural killer (NK). Sel B dan sel T mempunyai reseptor pada permukaan yang mampu mengenal antigen tertentu, sedangkan sel NK tidak memiliki reseptor untuk mengenal antigen. Pada manusia normal, sel limfosit B berjumlah 5-15% dan sel limfosit T berjumlah sekitar 65-80% dari jumlah total limfosit dalam tubuh. Kedua sel tersebut berperan respon spesifik di mana sel B berperan di dalam respon imun humoral dan sel T berfungsi dalam sistem imun seluler. Sedangkan sel natural killer berperan dalam respon imun nonspesifik (Harris, 1991).

Sel limfosit B adalah sel limfosit yang berasal dari sel hematopoetik di sumsum tulang belakang dan berdiferensiasi di dalam jaringan ekuivalen bursa, seperti di dalam hati atau limfa pada mamalia dan organ limfoid dekat kloaka pada unggas. Sel B menyusun sekitar 5-15% dari jumlah total limfosit dalam tubuh yang banyak terdapat pada pembuluh darah periferi, sumsum tulang, jaringan limfoid periferi, dan tonsil. Di dalam menjalankan fungsi kekebalan humoral, sel B bersifat spesifik terhadap antigen (senyawa asing) dan akan membesar membentuk limfoblast. Beberapa di antaranya membentuk plasmoblast yang kemudian membentuk banyak sel plasma. Sel plasma inilah yang mensintesis antibodi. Antibodi tersebut kemudian disekresikan ke dalam limfa dan menuju ke sistem sirkulasi. Antibodi ini akan bersirkulasi sebagai protein globulin yang bebas di dalam plasma. Demikian halnya yang terjadi pada limfosit B yang baru dibentuk dari limfoblast sehingga jumlah antibodi yang lebih banyak dapat terbentuk yang dihadapkan pada antigen yang sama. Setelah menerima rangsangan dari antigen atau mitogen, sel limfosit B akan mengalami proses perkembangan melalui dua jalur, antara lain 1) berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan imunoglobulin, dan 2) membelah lalu kembali dalam keadaan istirahat sebagai sel limfosit B memori. Rangsangan berikutnya pada sel limfosit B memori ini menyebabkan sel limfosit B berproliferasi menjadi sel plasma yang mensekresikan imunoglobulin spesifik (Roitt, 1971). Sel limfosit B mampu mengenal antigen yang berkadar sangat rendah. Hal ini dikarenakan sel B dewasa memiliki imunoglobulin permukaan (surface Ig atau sIg) yang berperan sebagai

reseptor. Dengan proses endositosis, antigen yang ditangkap sIg akan masuk ke dalam sitoplasma, kemudian akan diproses membentuk fragmen-fragmen. Selanjutnya melalui proses eksositosis, fragmen antigen ini akan dipresentasikan lagi pada permukaan membran bersama major histocompatibility complex kelas II (MHC II) pada sel limfosit T sehingga sel B dapat berfungsi juga sebagai antigen presenting cell (APC). Kekebalan seluler (limfositik) terbentuk apabila suatu antigen menyentuh dan merangsang limfosit T.



Sumber: Sompayrac, 2003

Gambar 4. Respon imun

Sel T merupakan sel darah putih yang bersifat nonfagositik yang terbentuk di sumsum tulang belakang dan kemudian berkembang di bagian timus limfosit yang berfungsi untuk mengenal antigen pada reaksi imun seluler. Secara kasat mata, sel limfosit T tidak dapat dibedakan bentuk dan ukurannya dengan sel B. Sel ini menyusun 65-85% dari semua limfosit dalam sirkulasi dan banyak terdapat di sekitar pembuluh periferi dan limfa (Kimball, 1990). Sel limfosit T tidak mampu berdiferensiasi menjadi sel plasma, tetapi tumbuh menjadi sel yang mampu menghasilkan faktor yang merangsang reaksi perusakan seluler. Faktor-faktor tersebut adalah faktor penghambat migrasi (MIF atau Migration Inhibiting Factor), faktor sitotaktik (mencederai berbagai jenis sel), faktor interferon, serta faktor lainnya, seperti interleukin. Zat-zat ini sebagian akan dilepas pada interaksi antara limfosit tersensitisasi

dengan antigen spesifik yang sesuai untuk menghancurkan sel asing. Di dalam proses pendewasaannya, sel T berdiferensiasi menjadi tiga populasi yang berbeda, yaitu sel Thelper (Th), sel Tsupresor (Ts), dan sel Tcytototoxic (Tc). Sel Th berfungsi untuk membantu sel B membentuk antibodi, sel Ts berfungsi untuk menekan aktivitas sel T yang lain dan sel B dalam pembentukan antibodi, sedangkan sel Tc berperan untuk menghancurkan sel alogenik dan sel sasaran yang mengandung virus secara spesifik (Roitt, 1971).

Sel Ts dan Tc merupakan sel T yang kehilangan antigen CD4, tetapi tetap menunjukkan antigen CD8 sehingga sel Ts dan Tc dikenal sebagai CD8⁺. Sebaliknya sel Th merupakan sel T yang kehilangan antigen CD8, tetapi menunjukkan CD4 sehingga dikenal sebagai CD4⁺. Sel T memiliki molekul T-cell antigen reseptor (TCR) yang dapat mengenali epitop suatu antigen melalui kerjasama dengan molekul protein permukaan pada APC (Antigen Presenting Cell), yaitu MHC. Sel T teraktivasi oleh antigen spesifik sehingga terstimulasi untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel T memori dan berbagai sel T efektor yang mensekresi berbagai limfokin. Limfokin ini akan berpengaruh terhadap aktivasi sel B, sel Tc, sel NK, dan sel-sel fagositik yang terlibat di dalam respon imun. Molekul CD4 pada sel Th merupakan molekul glikoprotein yang memiliki situs pengikatan khusus mengenali fragmen antigen yang dipresentasikan oleh APC dengan molekul MHC II misalnya oleh sel limfosit B. Interaksi seluler kompleks antigen-MHC II bersama interleukin-1 (IL-1), yang disekresi oleh makrofag, akan mengaktifkan protein G dan serangkaian proses hidrolisis fosfolipase C dan mengaktifkan kerja enzim protein kinase C yang berperan mensintesis IL-2. IL-2 terikat pada molekul reseptor yang baru sehingga terjadi autostimulasi proliferasi sel Th. Sel Th yang teraktivasi akan mensekresi interleukin-2, -4, dan -6 serta interferon gamma (IFN- γ) yang bertugas di dalam proses aktivasi sel B, meliputi proses pembelahan dan diferensiasi. IL-2 dan IFN- γ juga mampu meningkatkan aktivitas fagositik dan kemampuan membunuh patogen pada sel makrofag (Delves *et al.*, 2006).

2.4 Perkembangan Sel Limfosit

Sel limfosit merupakan sel darah putih yang bertanggung jawab terhadap respon imun. Karakteristik jumlah dari sistem imun memberikan diversitas, spesifikasi, memori dan self atau nonself recognition. Limfosit dalam sel darah putih di tubuh terdapat 20-40 %

dari total sel limfosit. Limfosit dibagi berdasarkan fungsi dan komponen membran sel menjadi 3, yaitu sel B, sel T, dan null cell (Kuby, 2000). Limfosit T naif adalah limfosit matang yang belum terdeferensiasi, belum pernah terpapar dengan antigen. Setelah terpapar dengan antigen yang diikat major histocompatibility complex (MHC) yang dipresentasikan antigen presenting cell (APC) atau rangsang sitokin spesifik akan berkembang menjadi subset limfosit T berupa CD4⁺ dan CD8⁺ dengan fungsi efektor yang berlainan (Baratawidjaya, 2000).

Pada permulaannya, progenitor sel T dalam timus tidak mengekspresikan CD8 dan CD4. Proses perkembangannya juga melalui beberapa tahapan. Timosit yang belum matang mengekspresikan CD8 dan CD4 dan sel ini akan meningkatkan kematangan sel T yaitu CD4⁺,CD8⁻ atau CD4⁻,CD8⁺. Sel T yang mampu mengenal pasti MHC ini akan dipilih untuk proses pematangan yang dikenali sebagai seleksi positif. MHC kelas I ini akan mengeluarkan sinyal instruksi untuk mengarahkan diferensiasi kepada jalur CD8. Sel T CD8⁺ naif memerlukan aktivasi dan diferensiasi lanjut untuk menjadi sel T efektor yang bisa melisis sel target yang terinfeksi antigen dan sel-sel tumor. Sel T CD8⁺ mengenali antigen yang dipaparkan oleh molekul MHC I, oleh karena molekul MHC I dapat ditemukan pada sel-sel tubuh yang memiliki nukleus, maka sel T CD8⁺ dengan mudah memonitor sel jika terjadi tanda-tanda infeksi. Sel T CD8⁺ juga akan diaktifasi menjadi sel T efektor setelah bertemu langsung dengan antigen pada APC profesional atau nonprofesional dan menerima “second signal” dan sitokin seperti IL-2, INF-gamma dan TNF-alpha yang dilepaskan oleh sel T helper CD4⁺ (Michael, 2006).

Terjadinya diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi Th1 dan Th2 tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon mikroba yang memacu reaksi imunitas. Mikroba lain yang mungkin memacu produksi IL-12 secara tidak langsung. Misalnya virus dan beberapa parasit memacu sel NK untuk memproduksi IFN-gamma yang memacu makrofag mengeluarkan IL-12. IL-12 berikatan dengan reseptor sel T CD4⁺ sehingga memacu untuk menjadi sel Th1. IL-12 juga meningkatkan produksi IFN-gamma dan aktifitas sitolitik yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dan sel NK sehingga memacu imunitas seluler. IFN-gamma yang diproduksi Th1 akan menghambat proliferasi sel Th2 sehingga meningkatkan dominasi sel Th1. Sel CD4 sangat diperlukan untuk *cell mediated immunity* serta *antibody mediated immunity* yang membantu mengikat antigen yang dipresentasikan oleh sel B. CD45 merupakan

reseptor spesifik leukosit berupa *protein tyrosine phosphatase* yang terletak pada sel-sel hematopoietic kecuali pada eritrosit dan platelet. CD45 juga biasa disebut sebagai antigen leukosit, T220 dan B220 pada mencit. CD45 merupakan protein yang berfungsi untuk regulasi Src kinase yang dibutuhkan untuk sinyal transduksi reseptor sel T dan sel B (Kung *et al*, 2000).

Sel T regulator merupakan subset sel T yang berfungsi mengontrol respon imun. Sel T regulator dibagi menjadi dua populasi yaitu sel TR CD4⁺CD25⁺ dan sel Tr1 yang diinduksi pada periferal melalui paparan antigen. Faktor transkripsi Foxp3 diidentifikasi sangat penting untuk perkembangan dan fungsi sel TR CD4⁺CD25⁺. Proliferasi sel TR CD4⁺CD25⁺ terjadi secara *in vivo* melalui antigen spesifik dan dapat merespon adanya peptida asing. Sel T regulator memiliki peranan dalam memelihara *self tolerance* dengan cara menekan respon imun yang berlebih, misalnya pada penyakit autoimun. Sel TR CD4⁺CD25⁺ mewakili sekitar 10% dari sel T CD4⁺ periferal pada mencit dan manusia (Thompson & Fiona, 2004).

2.5 Tanaman Sambiloto

Menurut Syamsuhidayat dan Hutapea (1991), tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Angiosperma
Kelas	: Dicotyledonae
Sub kelas	: Gamopetalae
Series	: Bicarpellatae
Ordo	: Personales
Bangsa	: Justiceae
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Andrographis</i>
Spesies	: <i>Andrographis paniculata</i> Nees



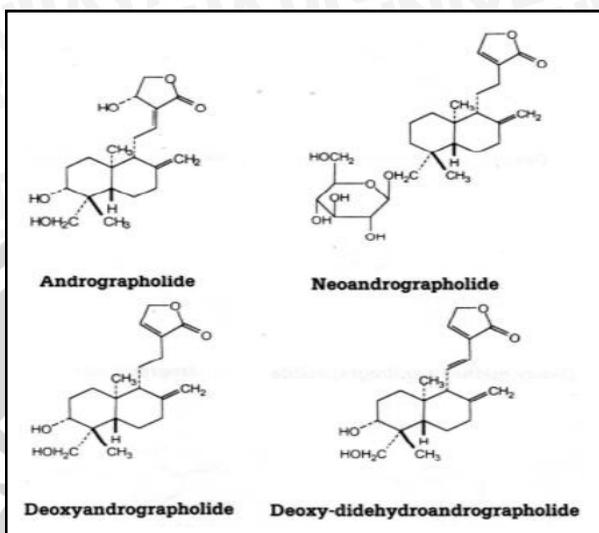
Sumber: Prapanza, 2003

Gambar 5. Tanaman sambiloto

Sambiloto merupakan tanaman liar yang banyak tersebar di Asia Tenggara, termasuk Indonesia (Syukur dan Hernani, 2002). Sambiloto tumbuh liar di tempat terbuka, seperti di kebun, tepi sungai, tanah kosong yang agak lembap, atau di pekarangan. Tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 700 m dpl (di bawah permukaan laut). Tanaman semusim, tinggi 50 - 90 cm, batang disertai banyak cabang berbentuk segi empat (kwadrangularis) dengan nodus yang membesar. Anatomi daunnya berbentuk tunggal, letaknya berhadapan, tangkai daunnya sangat pendek, bahkan hampir tidak bertangkai, bentuknya lanset, berukuran kira-kira 12 cm x 3 cm, bertepi rata, permukaan atas daun berwarna hijau dan bagian bawahnya berwarna lebih pucat. Bagian bunganya berbentuk malai, majemuk, ukurannya kecil, berwarna putih keunguan, terdapat diketiak dan ujung tangkai. Bagian buahnya kecil memanjang, ukurannya lebih kurang 0,3-0,4 x 1,5-1,90 cm, berlekuk, terdiri dari 2 rongga dan setiap rongga berisi 3-7 biji kecil berwarna coklat muda yang berbentuk gepeng, buahnya berwarna hijau dan akan pecah apabila sudah masak (Prapanza, 2003)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pertama kali diteliti oleh Borsma pada tahun 1896 dengan menemukan adanya kandungan Andrographolid yang rasanya sangat pahit. Kemudian pada tahun 1911 Cortner mengisolasi adanya senyawa lakton (SCHRI 1973 dalam Naiyana 2002). Menurut Deng (1978) lakton yang terkandung dalam

sambiloto terdiri dari empat jenis yaitu : Deoxyandrographolid, Andrographolid, Neoandrographolid, dan Deoxydehidroandrographolid. Andrographolid dan lakton yang terdapat pada sambiloto merupakan bahan aktif yang berfungsi sebagai obat (Deng 1978). Kadar andrografolid berkisar antara 2,5-4,6 % dari berat kering. Bahan kimia lain yang juga terdapat dalam sambiloto adalah diterpenoid yang terdiri dari deoxyandrographolid, -19-D-glukosa yang sebagian besar diisolasi dari daun (Techadamrongsin *et al.* dalam Naiyana 2002). Penelitian yang lebih jauh mengenai kandungan bahan kimia yang terdapat pada sambiloto ialah dengan ditemukannya senyawa diterpen lakton (Tang dan Eisenbrandt 1992 dalam Naiyana 2002), dan flavonoid (Zhu dan Liu 1984 ; Kuroyanagi *et al.* dalam Naiyana 2002). Menurut (Balman dan Connolly 1973, dan Kongkathip 1995 dalam Naiyana 2002) kandungan terpenting dari senyawa diterpenoid yang terdapat pada sambiloto adalah: 14-dioxyandrographis (DA, C₂₀H₃₀O₄), dan 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolid (DDA, C₂₀H₂₈O₄). Flavonoid diisolasi terbanyak dari akar yaitu polymethoxyflavon, andrographin, panicolin, mono-o-methylwightin, apigenin 7,4-dimethyl eter, alkane, keton, aldehyd, K, Ca, Na, asam kersil, dan damar. Kandungan lain adalah kalmegin (zat amorf) dan hablur kuning (Mahendra dan Rahmawati 2005), saponin, dan tanin. Saponin mempunyai dua jenis yaitu glikosida triterpenoid alkohol, dan glikosida struktur steroid. Tanin juga terdapat dua jenis yaitu: tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Konsentrasi bahan aktif yang terkandung pada sambiloto dapat dipengaruhi oleh lokasi tumbuh dan musim dimana tumbuh baik pada daerah tropis dan subtropis seperti Cina dan Asia Tenggara. Menurut (MPRI 1999 dalam Naiyana 2002) konsentrasi bahan aktifnya paling banyak ditemukan pada daun dan paling sedikit pada batang, sedangkan menurut (Sharma *et al.* dalam Naiyana 2002) konsentrasi bahan aktif paling sedikit ditemukan pada biji. Secara keseluruhan konsentrasi bahan aktif paling banyak terdapat pada tumbuhan muda daripada tumbuhan tua. Mardiswojo dan Harsono (1975) menyatakan andrografolid dan neo-andrografolid yang rasanya sangat pahit merupakan zat aktif yang berfungsi sebagai obat. Bahan aktif ini banyak mengandung unsur-unsur mineral, seperti kalium, kalsium, natrium, dan asam kersik.



Sumber: Wibudi, 2006

Gambar 6. Struktur kimia senyawa aktif sambilito

Bahan aktif andrografolid dan neoandrografolid yang rasanya sangat pahit banyak mengandung unsur-unsur mineral seperti kalium sehingga dapat membantu tubuh dalam mengeluarkan air dan garam yang dapat menurunkan tekanan darah. Zat andrografolid juga dapat meningkatkan sistem kekebalan dengan menghasilkan sel-sel darah putih untuk menghancurkan bakteri dan benda asing lainnya, serta mengaktifkan sistem *spleen* (Wibudi, 2006). Sedangkan neoandrografolid, dehydroandrografolid, mampu menurunkan demam yang disebabkan oleh berbagai bakteri misalnya *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, dan *Shigella dysenteriae* (Prapanza dan Lukito. 2003). Menurut Deng (1978) dehidroandrografolid juga berkhasiat sebagai anti radang dengan meningkatkan sintesa dari pituitari otak yang mengirim sinyal ke kelenjar adrenal untuk memproduksi kortisol yang merupakan anti radang alami. Menurut Sastrapradja (1978) tanaman sambilito memiliki sifat antipiretik (penurun demam), analgesik (penghilang rasa sakit), menghilangkan panas dalam, detoksikan, anti radang dan detumescent (mengecilkkan pembengkakan). Menurut Yulinah (2001), herba sambilito (*Andrographis paniculata*) merupakan salah satu bahan obat tradisional yang banyak dipakai di Indonesia, herba sambilito digunakan sebagai diuretika dan antipiretika, Susilo (1995) menambahkan, sambilito juga

dapat mengobati hepatitis, infeksi saluran empedu, disentri basiler, tifoid, diare, influenza, radang amandel (tonsilitis), abses paru, malaria, radang paru (pneumonia), radang saluran napas (bronkhitis), radang ginjal akut (pielonefritis), radang telinga tengah (OMA), radang usus buntu, sakit gigi, demam, kencing nanah (gonorae), kencing manis, TB Paru, batuk rejan, sesak napas dan kusta. Sambiloto mengandung laktone, flavonoid, alkane, aldehyd, mineral, asam kersik dan damar (Dalimartha, 2007).

Flavonoid merupakan pigmen yang umum terdapat pada seluruh dunia tumbuhan mulai dari fungus sampai angiospermae. Dalam tumbuhan sendiri flavonoid ini berfungsi sebagai pengatur tumbuh, pengatur fotosintesis, kerja anti mikroba, antivirus, dan kerja terhadap serangga. Efek flavonoid terhadap beberapa organisme sangat beraneka ragam sehingga dapat menjelaskan mengapa tumbuhan yang mengandung flavonoid dipakai dalam pengobatan tradisional. Flavonoid dapat bekerja sebagai inhibitor kuat pernafasan, menghambat fosfodiesterasi, menghambat aldoreduktase, monoamino oksidase, dan lipooksigenase. Penghambatan lipooksigenase dapat menimbulkan pengaruh yang lebih luas karena reaksi lipooksigenase merupakan langkah pertama menuju ke pembentukan hormon eikosanoid seperti prostaglandin dan tromboksan. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid juga dapat menurunkan agregasi platelet sehingga dapat mengurangi pembekuan darah, tetapi jika dipakai pada kulit flavonoid dapat menghambat pendarahan. Menurut (Vickery *et al.* dalam Rohimah 1997) flavonoid dapat menghambat perkembangan parasit dengan bertindak sebagai inhibitor enzim, mekanisme penghambatannya yaitu: dengan cara menghambat produksi energi dan sintesis asam-asam nukleat atau protein.

Produksi dan mutu simplisia sambiloto sangat dipengaruhi oleh kondisi agroekologi. Dari hasil analisis mutu, sambiloto di tanam di dataran tinggi menunjukkan kadar sari yang larut dalam air mempunyai kadar yang lebih tinggi dibandingkan dataran rendah (Yusron *et al.*, 2004). Kadar sari yang larut dalam air menunjukkan indikasi adanya kandungan zat berkhasiat dalam suatu tanaman yang terlarut. Komponen aktif dari sambiloto yaitu andrographolide, 14-deoxyandrographolide dan 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide yang diisolasi dari fraksi metanol mempunyai efek imunomodulator dan dapat

menghambat induksi sel penyebab HIV. Komponen-komponen tersebut meningkatkan proliferasi dan induksi IL-2 limfosit perifer darah manusia (Kumar et al. dalam Elfahmi, 2006). Dari hasil penelitian Cahyaningsih et al., 2003 bahwa dengan pemberian sambiloto dosis bertingkat dengan koksidiostat (preparat sulfa) akan menaikkan heterofil pada darah ayam. Dengan penambahan dosis sambiloto akan menaikkan heterofil, kenaikan tersebut diduga berkaitan erat dengan fungsi ganda dari sambiloto sebagai immunosupresan dan immunostimulan (Deng, 1978). Heterofil merupakan salah satu komponen sistem imun yaitu sebagai penghancur bahan asing yang masuk ke dalam tubuh (Tizard, 1987).

Mekanisme kerja dari herba sambiloto sebagai immunosupresan sangat terkait dengan keberadaan dari kelenjar adrenal (Yin dan Guo, 1993). Hal ini dikarenakan sambiloto dapat merangsang pelepasan hormon adrenokortikotropik (ACTH) dari kelenjar pituitari anterior yang berbeda di dalam otak yang selanjutnya akan merangsang kelenjar adrenal bagian kortek untuk memproduksi kortisol. Kortisol yang dihasilkan ini selanjutnya akan bertindak sebagai immunosupresan (West, 1995). Efek immunosupresan akan mengakibatkan timbulnya penurunan respon imun. Menurut Puri et al., 1993 bahwa sambiloto dapat merangsang sistem imun tubuh baik berupa respon antigen spesifik maupun respon imun non spesifik untuk kemudian menghasilkan sel fagositosis. Respon antigen spesifik yang dihasilkan akan menyebabkan diproduksinya limfosit dalam jumlah besar terutama limfosit B. Limfosit B akan menghasilkan antibodi yang merupakan plasma glikoprotein yang akan mengikat antigen dan merangsang proses fagositosis (Decker, 2000).

2.6 Histopatologi hepar

Aplikasi pembuatan histologis hepar dapat digunakan untuk analisis histologi. Histopatologi merupakan cabang ilmu biologi yang mempelajari kondisi dan fungsi suatu jaringan dalam hubungannya dengan penyakit. Histopatologi sangat penting kaitannya dengan diagnosis penyakit maupun untuk mengetahui efek dari suatu obat atau racun terhadap jaringan tertentu. Histopatologi dapat dilakukan dengan mengambil sampel jaringan dan mengamati jaringan, serta dibandingkan dengan kondisi jaringan normal sehingga dapat diketahui perbedaannya (Suntoro, 1983). Analisis histopatologis dapat dilihat dari beberapa parameter salah satunya adalah kerusakan sel. Kerusakan sel tersebut tergantung intensitas pemaparan yang dibatasi perubahan yang

dihasilkan sedikit dan mungkin tidak tampak perubahan morfologi maupun fungsi. Akan tetapi apabila paparan lebih kuat maka akan menyebabkan perubahan morfologi maupun fungsi dalam sel. Sebagian besar perubahan yang terjadi bersifat *reversible*, namun jika paparan menimbulkan efek *irreversible* maka kematian sel dapat terjadi. Beberapa contoh kerusakan atau perubahan seluler yang terjadi adalah degenerasi parenkimatosa, degenerasi hidrofik, perlemakan, atrofi, dan nekrosis (Kissane, 1985).

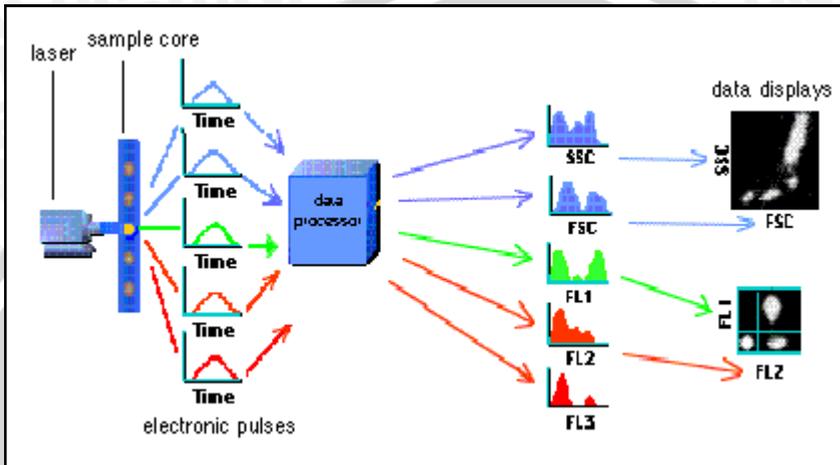
Suatu senyawa apabila diberikan secara oral akan masuk ke dalam tubuh melalui saluran cerna, kemudian ditransformasikan ke sirkulasi portal hepatic dan dibawa langsung menuju hati sehingga hati rentan terhadap pengaruh adanya suatu zat yang masuk dalam tubuh dalam jumlah relatif banyak dalam sirkulasi (Dewi, 2009). Bentuk perubahan gambaran histopatologis terhadap sel hepatosit dapat berupa degenerasi dan tanda-tanda nekrosis berupa kariolisis, karioreksis dan inti piknotik. Beberapa penyebab sel mengalami kerusakan dapat disebabkan oleh bahan kimia, mikroorganisme, virus serta substansi atau agen lain yang berbahaya (Junquera, 2005)

2.7 Flowcytometry

Flowcytometry adalah teknologi yang secara bersamaan mengukur dan kemudian menganalisis karakteristik fisik beberapa partikel tunggal, biasanya sel, karena mereka mengalir dalam aliran fluida melalui seberkas cahaya. Sifat-sifat yang diukur mencakup ukuran relatif partikel, granularitas relatif atau kompleksitas internal, dan intensitas fluoresensi relatif. Karakteristik ini ditentukan menggunakan sistem optik ke elektronik kopling yang mencatat bagaimana sel atau partikel memantulkan cahaya insiden laser dan memancarkan fluoresensi. Sebuah aliran cytometer terdiri dari tiga sistem utama: fluidics, optik, dan elektronik.

- Sistem fluidics mengangkut partikel di sungai dengan sinar laser untuk interogasi.
- Sistem optik terdiri dari laser untuk menerangi partikel dalam aliran sampel dan filter optik untuk mengarahkan sinyal cahaya yang dihasilkan dengan detektor yang sesuai.
- Sistem elektronik mengubah sinyal cahaya yang terdeteksi menjadi sinyal elektronik yang dapat diproses oleh komputer. Untuk beberapa instrumen dilengkapi dengan fitur penyortiran, sistem elektronik juga

mampu memulai keputusan penyortiran untuk mengisi dan menangkis partikel.



Sumber: Biosciences, 2000

Gambar 7. Skema kerja *Flowcytometry*

Dalam mesin cytometer, partikel dibawa ke laser dalam aliran fluida. Setiap partikel tersuspensi sel 0,2-150 mikrometer dalam ukuran untuk analisis. Sel-sel dari jaringan padat harus dipisahkan sebelum analisis. Bagian dari aliran fluida di mana partikel berada pada sampel. Ketika partikel melewati intercept laser, mereka menyebarkan sinar laser. Setiap molekul pada partikel akan berpendar. Pendaran yang tersebar dan dikumpulkan tepat pada posisi lensa. Kombinasi splitter dan filter mengarahkan cahaya yang tersebar dengan detektor pendaran yang sesuai. Detektor menghasilkan sinyal elektronik sebanding dengan sinyal optik yang dipendarkan. Daftar modus data dikumpulkan pada setiap partikel. Karakteristik atau parameter dari setiap peristiwa didasarkan pada hamburan cahaya dan sifat pendaran. Data dikumpulkan dan disimpan dalam komputer. Data ini dapat dianalisis untuk memberikan informasi tentang sub-populasi dalam sampel (Biosciences, 2000).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Juni 2013. Pelaksanaan penelitian bertempat di Animal Room Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Deskripsi Hewan Coba

Hewan yang digunakan untuk penelitian adalah mencit jantan (*Mus musculus*) galur BALB/c berumur 6 minggu dengan kondisi sehat, bergerak aktif, rambut tidak rontok, tidak memiliki kecacatan. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan yaitu kontrol, dosis I, dosis II, dosis III dengan masing-masing perlakuan 5 kali ulangan, sehingga jumlah mencit yang digunakan adalah 20 ekor.

3.2.2 Perlakuan Hewan Coba

Penelitian ini akan melakukan perlakuan oral selama 14 hari sebanyak 2 kali per hari pada pagi dan sore dengan penggunaan 4 macam perlakuan dosis, seperti pada tabel berikut ini:

Tabel 1. Kelompok Perlakuan

Mencit BALB/c	Kontrol (Tanpa Perlakuan Oral Fraksi <i>Ethanol</i> Daun Sambiloto)
	Dosis I (Perlakuan Oral Fraksi <i>Ethanol</i> Daun Sambiloto 0,1 mg/g BB)
	Dosis II (Perlakuan Oral Fraksi <i>Ethanol</i> Daun Sambiloto 0,5 mg/g BB)
	Dosis III (Perlakuan Oral Fraksi <i>Ethanol</i> Daun Sambiloto 1 mg/g BB)

3.2.3 Preparasi Sampel Fraksi *Ethanol* Daun Sambiloto

Fraksisi menggunakan metode maserasi cara dingin dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Tanaman sambiloto diambil bagian daunnya saja, dikeringkan menggunakan oven suhu 37°C, setelah kering

ditumbuk dengan mortar dan pestle. Serbuk simplisia daun sambiloto dimasukkan ke dalam maserator kemudian ditambahkan pelarut etanol 95% sampai seluruh serbuk terendam dan didiamkan selama 24 jam sambil terus diaduk. Setelah 24 jam maserat ditampung dan dilakukan maserasi ulang, maserat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan oven suhu 60°C sampai terbentuk fraksi kental seperti pasta. Fraksisi dilakukan untuk menarik semua zat yang terkandung dalam daun sambiloto dengan menggunakan pelarut etanol 95% dan didapatkan fraksi kental dari daun sambiloto tersebut. Setelah didapatkan pasta daun sambiloto kemudian dilarutkan dengan akuades steril untuk membuat larutan stok masing-masing sebanyak 400 mg/100 ml (dosis I), 2 g/100 ml (dosis II), dan 4 g/100 ml (dosis III) dalam akuades steril.

3.2.4 Isolasi Sel Limfosit dari Organ *Spleen*

Mencit yang sudah diberi perlakuan kemudian didislokasi leher untuk membunuh mencit tanpa merusak organ dalamnya, ditempatkan pada papan sectio dan dilakukan pembedahan pada bagian peritoneal. Diisolasi organ berupa *spleen*, kemudian dicuci PBS steril 3 kali. Organ *spleen* dimasukkan ke dalam cawan petri berbeda yang berisi PBS steril, dipencet menggunakan pangkal spuit dengan arah pemencetan searah jarum jam ditekan dari atas ke bawah sebanyak 2-3 kali. Setelah halus kemudian disaring dengan wire. Suspensi yang didapatkan disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm dengan suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan yang didapat dibuang, pelet diresuspendi dengan PBS steril sebanyak 100-1000 µm dan dihomogenasi dalam eppendorf. Disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 3 menit, kemudian disimpan pada suhu 4°C dalam kulkas untuk dilakukan analisis *flowcytometry*.

3.2.5 Penghitungan Sel Limfosit Menggunakan *Haemocytometer*

Suspensi pelet dari hasil isolasi organ *spleen* diambil sebanyak 5 µl, ditambahkan 95 µl *Evan's Blue* dan dihomogenkan. Sel yang mati akan terwarnai dan sel yang hidup dihitung pada kamar hitung dalam *haemocytometer*. Hasil penghitungan digunakan untuk analisa lanjutan menggunakan *flowcytometry*.

3.2.6 Analisis Kuantitatif Sel T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD62L⁺, CD8⁺CD62L⁺, CD4⁺CD25⁺, Sel B B220⁺, dan Gr1 Menggunakan *Flowcytometry*

Pelet dari hasil isolasi *spleen* dalam eppendorf ditambahkan antibodi monoklonal yang digunakan adalah phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse CD8 (clone 53-6.7), fluorescein isothiocyanate (FITC)- atau allophycocyanin (APCn)-conjugated anti-mouse CD4 (clone GK1.5), PE-conjugated anti-mouse CD62L, FITC-conjugated anti-mouse Gr-1, FITC-conjugated anti-mouse CD25 (clone PC61.5), dan PE-conjugated anti-B220 lalu disimpan di dalam ice box. Kemudian dilakukan koneksi antara komputer dengan *flowcytometry* pada keadaan “*acquiring*” dan setting *software BD Cell Quest Pro*TM sesuai kebutuhan meliputi setting instrument, banyaknya sel yang akan dianalisis, label antibodi yang digunakan, kekuatan eksitasi laser, nama sampel, dan penentuan gated area limfosit pada plot histogram. Dilakukan setting plot pada *acquiring mode*, label CD4⁺ pada sumbu X dan CD8⁺ pada sumbu Y, label CD4⁺ pada sumbu X dan CD25⁺ pada sumbu Y, label CD4⁺ pada sumbu X dan CD62L⁺ pada sumbu Y, lalu dilakukan *gating area* (G1=R1). *Flowcytometry* dipastikan dalam keadaan *Low-Run*. Setelah instrument siap, pelet yang sudah diberi antibodi dimasukkan tabung kuvet pada *flowcytometry* dengan mikropipet, lalu ditambahkan 400 µm PBS steril dan dihomogenkan dengan cara pipetting. Kuvet dipasang pada *nozzle BD Biosciences FACSCalibur*TM *flowcytometry*.

3.2.7 Preparat Histologi Hepar

Prosedur pembuatan preparat histologi hepar yaitu organ hati yang terletak di bagian tengah lobus diisolasi dari mencit yang sudah dibedah. Organ hati dicuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali dan dimasukkan larutan formalin 4 %. Organ hati selanjutnya didehidrasi dengan etanol bertingkat mulai 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 96% masing-masing 20-30 menit, dilanjutkan etanol absolut selama dua kali masing-masing 30 menit. Kemudian organ direndam dengan xilol 1 selama 30 menit pada suhu ruang, dilanjutkan xilol 2 selama 30 menit. Perendaman dilanjutkan dalam xilol : parafin (3:1, 1:1, dan 1:3) dan parafin murni masing-masing selama 30 menit pada suhu 56-58C dalam oven. Organ hati ditanam pada parafin cair dalam blok cetakan sambil dilakukan penarikan gelembung udara dalam parafin, dibiarkan sampai parafin mengeras dan disimpan suhu 4°C. Organ dalam parafin diiris setebal 5 µm menggunakan mikrotom. Hasil irisan diambil dengan kuas

dan diletakkan dalam waterbath berisi air suhu 39°-40°C. Irisan yang sudah merenggang diambil dengan gelas objek, dikeringanginkan. Selanjutnya preparat dideparafinasi dengan cara dicelupkan dalam xilol sebanyak dua kali masing-masing selama 10 menit untuk menghilangkan parafin. Preparat direndam dalam seri etanol bertingkat (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Preparat dicuci akuades selama 5 menit dan diwarnai Hematoksilin selama 5 menit, kemudian dicuci akuades selama 30 detik dan direndam etanol bertingkat (30%, 60% dan 70%) masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan eosin selama 10 menit, dicelupkan sebentar dalam alkohol 80%, 90%, 96%, dan 100%, dilanjutkan *clearing* dengan xilol sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit dan mounting menggunakan entelan. Pewarna hematoksilin akan memberikan warna ungu pada inti sel dan eosin akan memberikan warna merah pada sitoplasma. Kemudian preparat dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya. Pengamatan preparat difokuskan pada ada tidaknya kerusakan organ hepar sebagai organ antitoksik.

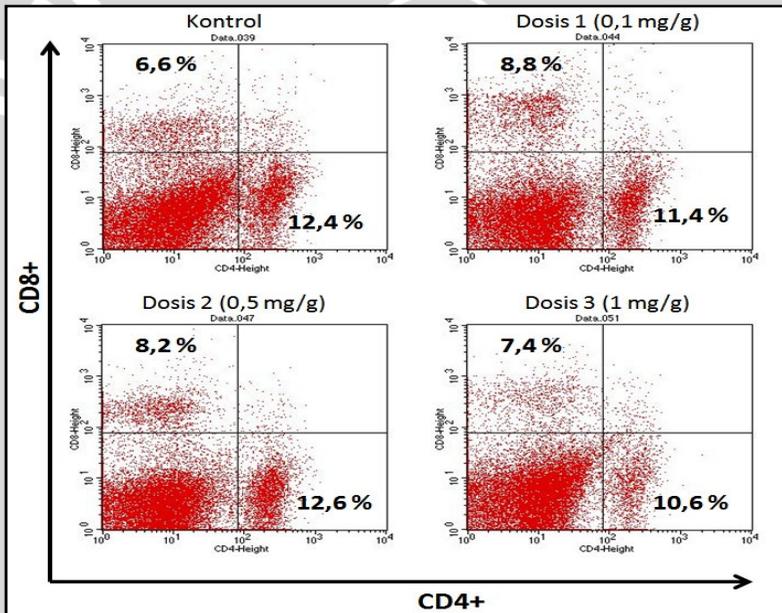
3.2.8 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji ANOVA selang kepercayaan 95%, data jumlah relatif dan absolut sel T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD62L⁺, CD8⁺CD62L⁺, sel B B220 dan Gr1 diuji statistik dengan uji normalitas, uji homogenitas varian. Data yang telah terdistribusi normal dengan variasi homogen, diuji dengan one-way ANOVA dengan nilai $\alpha=0.05$. apabila diperoleh $p>0.05$ maka tidak ada beda nyata antar perlakuan, sebaliknya jika $p<0.05$ maka ada beda nyata antar perlakuan. Kemudian dilakukan *post-hoc test* dengan uji Tukey HSD (*High Significant Difference*). Data diuji statistik menggunakan program SPSS 16.0 for Windows.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Jumlah Total Sel T CD4⁺ dan CD8⁺

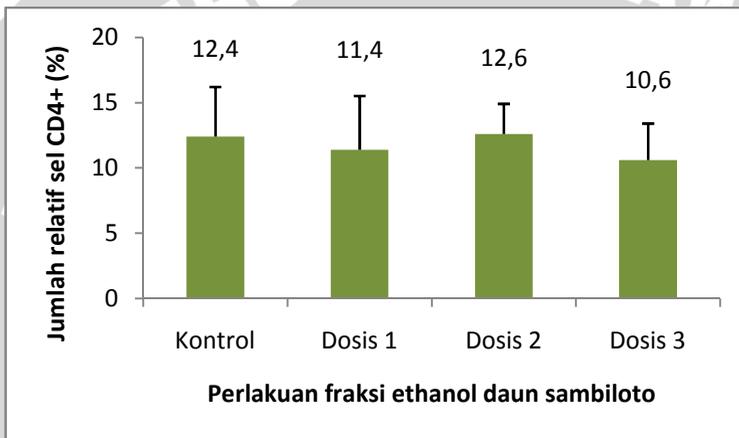
Analisis jumlah relatif dan absolut sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui pengaruh aktifitas biologis dari pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto terhadap peningkatan kuantitas sel CD4⁺ dan CD8⁺ yang juga bisa digunakan sebagai parameter tingkat kesehatan dari hewan coba. Keadaan tingkat kesehatan mencit sebagai hewan coba tersebut dapat dilihat dari karakter sistem imunnya yang telah dianalisis menggunakan Flowcytometry.



Gambar 8. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ hasil analisis flowcytometry pada organ *spleen*

Hasil analisis Flowcytometry (Gambar 8) menunjukkan profil jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang telah diberikan perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto. Data hasil Flowcytometry tersebut kemudian dianalisis statistika (Gambar 9) menunjukkan tidak memiliki perbedaan diketahui dari peningkatan dan penurunan yang terjadi pada setiap

perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Jumlah sel T CD4⁺ mengalami peningkatan pada perlakuan Dosis 2 (0,5 mg/g BB) namun tidak signifikan ($p>0,05$) menjadi 12,6 % atau 12,52 juta sel (Lampiran 12) dibandingkan dengan perlakuan kontrol sebesar 12,4 % atau 12,25 juta sel (Lampiran 12). Sedangkan jumlah sel CD4⁺ yang mengalami penurunan namun tidak signifikan ($p>0,05$) pada perlakuan Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dengan nilai sebesar 11,4 % atau 12,02 juta sel (Lampiran 12) dan nilai penurunan terendah pada Dosis 3 (1 mg/g BB) menjadi 10,6 % atau 10,08 juta sel (Lampiran 12).



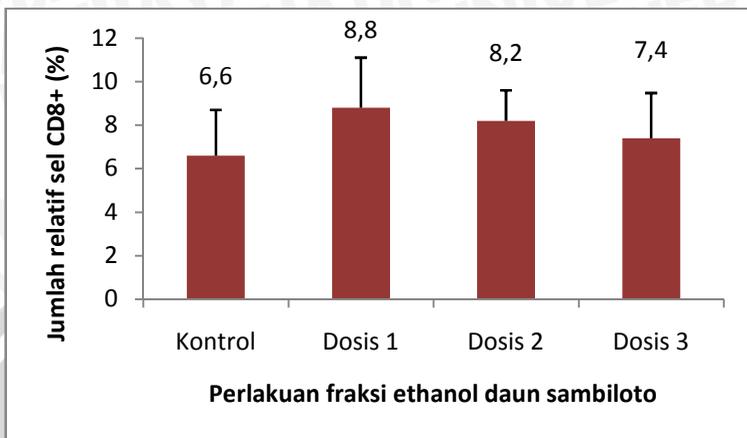
Gambar 9. Jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan: Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Jika jumlah sel T CD4⁺ yang lebih banyak mengalami penurunan namun tidak signifikan sedangkan jumlah sel T CD8⁺ mengalami peningkatan pada seluruh perlakuan dosis meskipun tidak signifikan ($p>0,05$) (Gambar 10). Pada perlakuan kontrol sebesar 6,6 % atau 6,78 juta sel (Lampiran 12) mengalami peningkatan jumlah sel T CD8⁺ tertinggi sebesar 8,8 % atau 8,69 juta sel (Lampiran 12), pada perlakuan Dosis 1 (0,1 mg/g BB), pada Dosis 2 (0,5 mg/g BB) mengalami peningkatan menjadi 8,2 % atau 8,6 juta sel (Lampiran 12) dan peningkatan paling kecil terjadi pada perlakuan Dosis 3 (1 mg/g BB) menjadi 7,4 % atau 7,28 juta sel (Lampiran 12). Pemberian perlakuan dosis untuk mengetahui jumlah sel T CD4⁺ masih belum bisa ditentukan berapa dosis optimum untuk meningkatkan ekspresi sel T CD4⁺

meskipun mencit yang digunakan free patogen yang belum pernah terpapar oleh antigen. Kemungkinan senyawa andrografolid yang terkandung dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto mampu menjadi immunosupresan sel T naive $CD4^+CD8^+$ yang menghambat proliferasi maupun deferensiasi sel T naive menjadi subset sel T $CD4^+$ yang spesifik sebagai sel T efektor Th1 maupun Th2.

Peningkatan jumlah sel T $CD4^+$ umumnya disebabkan karena sel T $CD4^+$ yang telah teraktivasi mampu mengekspresikan beberapa molekul permukaan misalnya seperti CD8 atau CD25 yang memiliki peran dalam meregulasi aktifitas sel-sel efektor yang telah mengalami aktivasi akibat adanya paparan suatu antigen. Akibat adanya paparan antigen ini menyebabkan terjadinya interaksi antara sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$, dimana sel $CD4^+$ akan mengenali suatu antigen misalnya mikroba yang masuk dalam pembuluh darah dan mengaktifkan makrofag yang berperan dalam membunuh mikroba tersebut. Sedangkan $CD8^+$ akan mengenali sitoplasma suatu sel yang telah terinfeksi mikroba dan membunuh sel yang telah terinfeksi tersebut. $CD8^+$ dibutuhkan dalam kontrol sitokin proinflamasi dan membantu kinerja sel T $CD4^+$ ketika $CD4^+$ tidak mampu lagi menangani antigen yang masuk ke dalam tubuh, hal ini menyebabkan proliferasi dan deferensiasi sel limfosit T menjadi sek T sitotoksik tidak mengalami peningkatan (Wahyuni, 2009).

Jumlah sel T $CD8^+$ yang cenderung mengalami peningkatan terutama pada Dosis 1 (0,1 mg/g BB) bisa digunakan sebagai acuan dosis optimum dalam peningkatan sel T $CD8^+$. Namun peranan sel T $CD8^+$ yang berperan sebagai sel Tc atau sel T sitotoksik seharusnya akan mengalami peningkatan jika tubuh mengalami paparan antigen atau adanya sel yang dimungkinkan sel kanker. Meskipun mencit yang digunakan model sehat tidak tertutup kemungkinan adanya pengaruh lingkungan yang menyebabkan antigen mampu masuk ke dalam tubuh hewan coba dan menstimulasi proliferasi dan deferensiasi sel T naive $CD4^+CD8^+$ menjadi spesifik sel T $CD8^+$ sebagai sel Tc yang berperan dalam mengeliminasi antigen yang menginfeksi dalam tubuh. Kemungkinan selanjutnya senyawa yang terkandung di dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto berperan sebagai immunostimulan yang mampu meningkatkan proliferasi dan deferensiasi sel T naive menjadi subset sel T $CD8^+$.



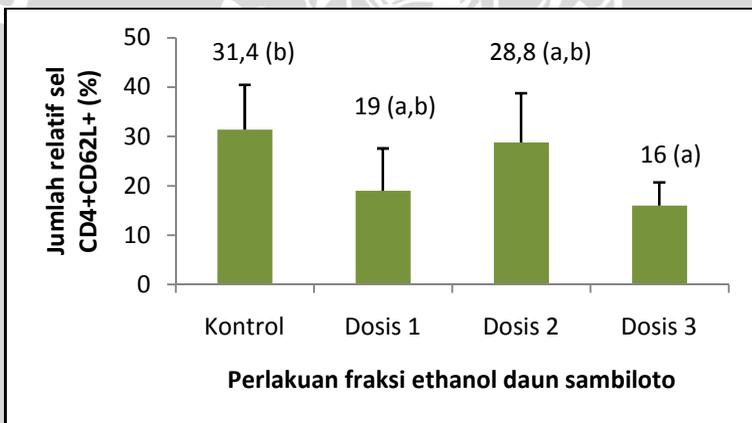
Gambar 10. Jumlah relatif sel T CD8⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan: Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Sel T CD8⁺ atau Sel Tc (sitotoksik) adalah limfosit yang berasal dari sel dalam sumsum tulang. Sel tersebut matang dalam timus untuk mendapat reseptor spesifik terhadap fragmen antigen. Kebanyakan sel Tc adalah CD8⁺ dan hanya mengenal antigen yang berhubungan dengan MHC kelas I. Fungsi utamanya mengeliminasi sel yang terinfeksi antigen. Sel Tc akan juga menghancurkan sel ganas dan sel histoinkompatibel seperti halnya pada penolakan pada tranplantasi. Dalam keadaan tertentu dapat pula menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri (Pimentel, 2010).

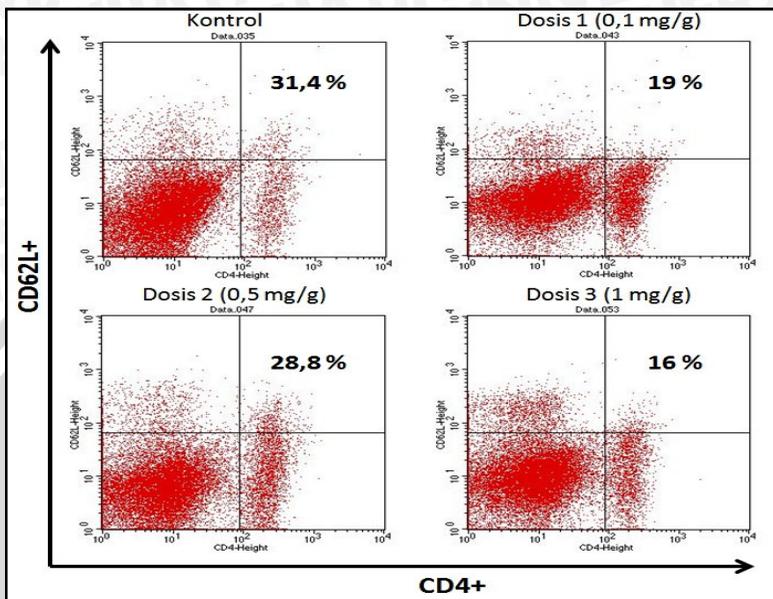
Keseluruhan analisis yang telah dilakukan menunjukkan mencit yang digunakan sebagai hewan coba dalam kondisi yang sehat dengan karakter sel T CD4⁺ yang memiliki jumlah lebih banyak daripada sel T CD8⁺. Namun seluruh data menunjukkan hasil yang belum signifikan, sehingga mungkin diperlukan waktu perlakuan yang lebih lama agar bisa terlihat perbedaan yang lebih signifikan. Peningkatan maupun penurunan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ kemungkinan dikarenakan adanya aktifitas biologis dari senyawa flavonoid atau andrografolid yang terkandung dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto. Senyawa tersebut selain memiliki peran sebagai imunostimulan juga memiliki peran sebagai immunosupresan. Efek immunosupresan inilah yang memungkinkan terjadinya penghambatan proliferasi sel limfosit dengan penggunaan dosis tertentu (Middleton, 2000).

4.2. Analisis Jumlah Total Sel CD4⁺CD62L⁺ dan CD8⁺CD62L⁺

Hasil analisis Flowcytometry (Gambar 12) menunjukkan profil jumlah sel T CD4⁺CD62L⁺ yang telah diberikan perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto. Data tersebut dianalisis statistika (Gambar 11) tidak memiliki perbedaan yang signifikan ($p>0,05$) dapat diketahui dari peningkatan dan penurunan yang terjadi pada setiap perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Data yang akan dibahas adalah jumlah sel T naive (CD4⁺CD62L⁺) pada setiap perlakuan. Jumlah sel T CD4⁺CD62L⁺ mengalami penurunan pada seluruh perlakuan. Perlakuan Dosis 2 (0,5 mg/g BB) turun menjadi 28,8 % atau 29,4 juta sel (Lampiran14) dibandingkan dengan perlakuan kontrol sebesar 31,4 % atau 29,8 juta sel (Lampiran 14), perlakuan Dosis 1 (0,1 mg/g BB) turun menjadi 19 % atau 19,62 juta sel (Lampiran 14) dan penurunan paling rendah pada Dosis 3 (1 mg/g BB) menjadi 16 % atau 14,89 juta sel (Lampiran 14).



Gambar 11. Jumlah relatif sel T CD4⁺CD62L⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan: Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

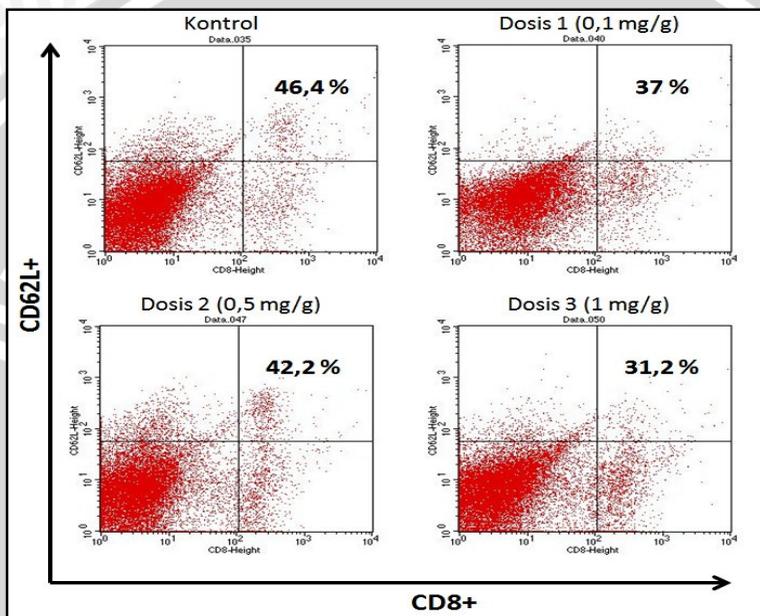


Gambar 12. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4⁺CD62L⁺ hasil analisis flowcytometry pada organ *spleen*

Hasil seluruh analisis yang dilakukan menunjukkan adanya penurunan terhadap jumlah sel T CD4⁺CD62L⁺ setelah pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto. Hal ini kemungkinan senyawa aktif dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto mampu merangsang terjadinya diferensiasi sel T naive menjadi sel efektor dimana CD62L sebagai marker aktivasi sel. Jika terdapat paparan antigen dalam tubuh, sel T CD4⁺CD62L⁺ akan berubah menjadi subset sel T CD4⁺. Hampir sama dengan pola jumlah sel T CD4⁺ (Gambar 9) yang menunjukkan penurunan pada seluruh perlakuan dosis.

Jumlah sel T naive CD4⁺CD62L⁺ ini kemungkinan dipengaruhi senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi *ethanol* bisa berperan sebagai imunostimulan maupun immunosupresan. Sebagai imunostimulan akan berperan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel T naive CD4⁺CD62L⁺ menjadi subset sel T CD4⁺. Meskipun profil flowcytometry (Gambar 11) tidak ditampilkan data mengenai jumlah sel T CD4⁺ pada kolom *low right* namun dapat diperkirakan bahwa jumlah sel T CD4⁺ lebih tinggi daripada sel T naive CD4⁺CD62L⁺, sehingga kemungkinan cukup banyak sel T CD4⁺CD62L⁺ yang bermigrasi menjadi sel T CD4⁺. Kemungkinan berikutnya senyawa aktif yang

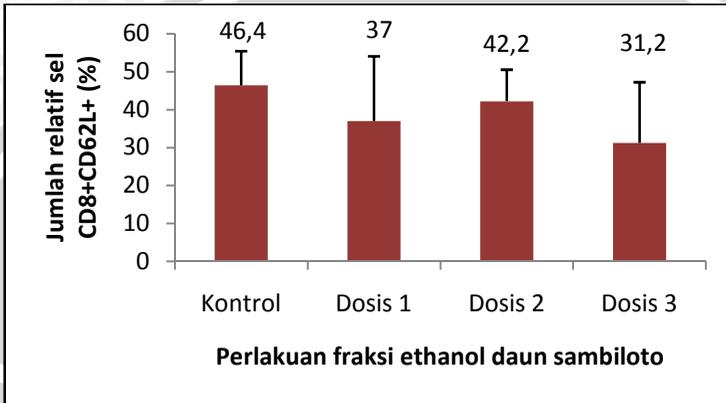
terandung dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto berperan sebagai immunosupresan yang berperan langsung dalam menekan proliferasi sel T naive $CD4^+CD62L^+$ sehingga jumlahnya di bawah jumlah sel T naive $CD4^+CD62L^+$ pada perlakuan kontrol tanpa perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto.



Gambar 13. Profil persentase jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ hasil analisis flowcytometry pada organ *spleen*

Hasil analisis Flowcytometry (Gambar 13) menunjukkan profil jumlah sel T $CD8^+CD62L^+$ yang telah diberikan perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto. Data tersebut dianalisis statistika (Gambar 14) tidak memiliki perbedaan yang signifikan ($p>0,05$) dapat diketahui dari peningkatan dan penurunan yang terjadi pada setiap perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Data yang akan dibahas adalah jumlah relatif sel T naive ($CD8^+CD62L^+$) pada setiap perlakuan. Jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ mengalami penurunan pada seluruh perlakuan. Perlakuan Dosis 2 (0,5 mg/g BB) turun menjadi 42,2 % atau 42,18 juta sel (Lampiran 16) dibandingkan dengan perlakuan kontrol sebesar 46,4

% atau 42,55 juta sel (Lampiran 16), perlakuan Dosis 1 (0,1 mg/g BB) turun menjadi 37 % atau 38,15 juta sel (Lampiran 16) dan penurunan paling rendah pada Dosis 3 (1 mg/g BB) menjadi 31,2 % atau 28,6 juta sel (Lampiran 16).



Gambar 14. Jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan: Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Hasil analisis yang dilakukan menunjukkan penurunan pada semua perlakuan dosis meskipun tidak signifikan. Hal ini mungkin dikarenakan perlakuan dosis yang kurang tinggi dan waktu perlakuan yang lebih lama. Senyawa aktif yang terkandung di dalam fraksi *ethanol* daun *sambiloto* seharusnya mampu meningkatkan jumlah sel T naive $CD8^+CD62L^+$ pada organ *spleen*. Penurunan jumlah sel T naive $CD8^+CD62L^+$ memiliki profil yang tidak berbeda dengan jumlah sel T naive $CD4^+$ (Gambar 9) dan jumlah sel T naive $CD4^+CD62L^+$ (Gambar 12). Kemungkinan yang terjadi tidak jauh berbeda dengan yang terjadi pada sel T naive $CD4^+CD62L^+$. Analisis jumlah sel T naive $CD8^+CD62L^+$ tersebut masih belum bisa ditentukan dosis optimal karena tidak ada kecenderungan kenaikan jumlah sel meskipun tidak signifikan.

$CD62L^+$ atau L selektin merupakan molekul adhesi yang memiliki fungsi perlekatan dan rolling pada sel endotel pembuluh darah. Molekul tersebut mampu diekspresikan oleh sel T naive $CD4^+CD62L^+$ maupun $CD8^+CD62L^+$. Sel T naive ini akan mengalami sirkulasi di dalam darah, *spleen*, dan lymphnode periferol hingga suatu saat bertemu dengan

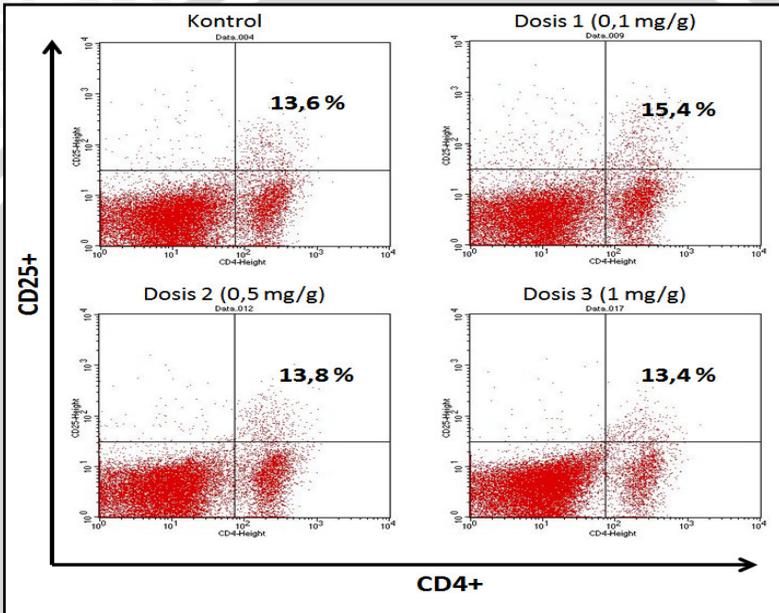
suatu antigen. Jika sudah bertemu dengan suatu antigen maka sel T naive akan teraktifasi dan kehilangan molekul CD62L⁺. Molekul CD62L⁺ mampu diekspresikan oleh sel T naive dalam individu normal yang sehat lebih dari 80%. Sedangkan pada individu tidak sehat sel T naive akan mengalami penurunan ekspresi CD62L⁺ pada organ lymphnode periferal dan sel T akan teraktivasi. Selanjutnya molekul CD62L⁺ melakukan down regulated pada sel T yang akan menghalangi masuk ke lymphnode dalam sel endotel. Hal ini untuk mencegah killing terhadap APC sel dendritik karena adanya aktivasi sel T CD8⁺ dan peningkatan sel T untuk melawan antigen yang masuk (Tedder, 1995).

4.3. Analisis Jumlah Total Sel CD4⁺CD25⁺

Hasil analisis Flowcytometry (Gambar 15) menunjukkan profil jumlah sel T naive CD4⁺CD25⁺ yang telah diberikan perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto. Hasil analisis statistika persentase jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD4⁺CD25⁺ masing-masing perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto (Gambar 16) menunjukkan sel T naive CD4⁺CD25⁺ pada perlakuan kontrol sebesar 13,6 % atau 14,7 juta sel (Lampiran 18) mengalami peningkatan jumlah sel T CD4⁺CD25⁺ yang tidak signifikan ($p>0,05$) menjadi 15,4 % atau 17,2 juta sel (Lampiran 18) pada perlakuan Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dan pada Dosis 2 (0,5 mg/g BB) menjadi 13,8 % atau 15,81 juta sel (Lampiran 18). Sedangkan penurunan yang tidak signifikan ($p>0,05$) terjadi pada perlakuan Dosis 3 (1 mg/g BB) menjadi 13,4 % atau 15,56 juta sel (Lampiran 18).

Jumlah sel T CD4⁺CD25⁺ dalam penelitian ini mengalami peningkatan pada Dosis 1 dan Dosis 2, namun mengalami penurunan jumlah sel pada Dosis 3 setelah perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto. Kemungkinan jika dilakukan perlakuan dengan waktu yang lebih lama lagi akan menunjukkan kecenderungan meningkatkan jumlah sel meskipun peran sel T CD4⁺CD25⁺ sebagai sel T regulator dalam penelitian masih belum jelas karena belum didukung analisis tentang keberadaan ekspresi Foxp3. Foxp3 inilah yang memiliki peran penting untuk menentukan fungsi dari sel T CD4⁺CD25⁺ sebagai imunomodulator. Jika data dalam penelitian ini juga menganalisis ekspresi Foxp3, maka kemungkinan jumlah sel CD4⁺CD25⁺ yang cenderung meningkat sangat berguna dalam menjaga keseimbangan sistem imun dalam tubuh karena sel T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

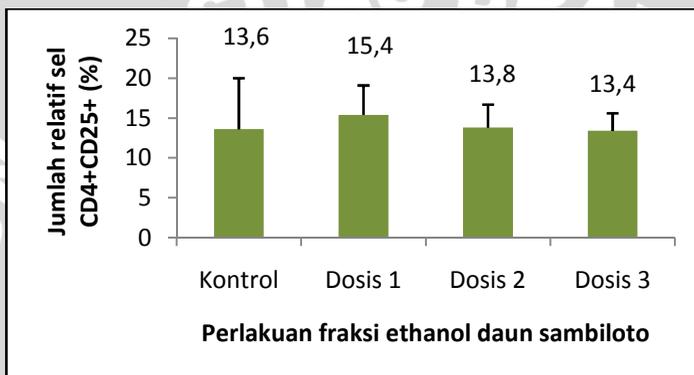
mengendalikan kerja sistem imun yang berlebih terutama jika setelah adanya paparan antigen. Sel T $CD4^+CD25^+$ tanpa ekspresi Foxp3 akan menjadi sel T naive $CD4^+CD25^+$ yang akan terdeferensiasi menjadi sel T $CD4^+$ sebagai sel T efektor karena ada paparan antigen.



Gambar 15. Profil persentase jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ hasil analisis flowcytometry pada organ *spleen*

Sel $CD4^+CD25^+$ ini diduga adalah sel konvensional yang mengekspresikan molekul permukaan CD25 dan sel T regulator yang pasti akan meningkat seiring dengan masuknya senyawa asing yang dimasukkan ke dalam tubuh. Molekul permukaan CD25 dikenal pula sebagai reseptor IL2- α , yang dapat diekspresikan oleh sel-sel konvensional selain sel T $CD4^+$ (Lee, 2006). Sel T regulator $CD4^+CD25^+$ memiliki kendali yang dapat meningkatkan ekspresi IL-10 dan IFN- γ . Sel T $CD4^+CD25^+$ juga disebut sel pintar yang memiliki fungsi sebagai regulator sekaligus supresor, menekan aktivitas sel imun lainnya akibat dari sekresi sitokin proinflamasi, namun sel T $CD4^+CD25^+$ akan berhenti proliferasinya saat sistem imun tidak lagi mampu mengatasi antigen yang menyerang tubuh. Sel T $CD4^+CD25^+$ memiliki kemampuan sebagai regulator yang bisa mencegah

perkembangan sel yang bersifat autoreaktif. Molekul permukaan yang disebut dengan CD25 adalah reseptor penting dalam merespon keberadaan IL-2 yang memiliki tiga jenis reseptor meliputi alfa, beta, dan gamma (Rifa'i, 2009). Selain itu sel $CD4^+CD25^+$ mampu bertindak sebaliknya yaitu berperan sebagai sel efektor jika tidak mengekspresikan Foxp3 ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$). Tanpa ekspresi Foxp3 maka sel T $CD4^+CD25^+$ merupakan sel konvensional yang telah terpapar antigen sehingga teraktivasi menjadi sel efektor (Rifa'i, 2008).

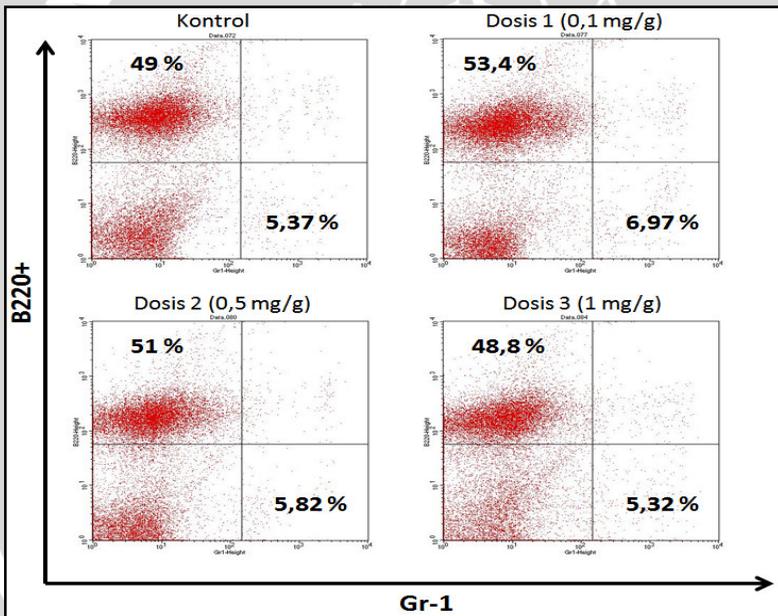


Gambar 16. Jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan: Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Reseptor IL-2R (CD25) banyak diekspresikan oleh limfosit $CD4^+CD25^+$, kelompok limfosit dengan peran utama sebagai pengontrol dan penjaga toleransi imunitas. Bukti terbaru menunjukkan bahwa IL-2 terlibat dalam pengaturan perkembangan dan aktivitas $CD4^+CD25^+$. Melalui pengaturan ekspresi Foxp3, IL-2 telah terbukti berperan dalam menjaga homeostasis system imun melalui $CD4^+CD25^+$. Meskipun $CD4^+CD25^+$ diperlukan untuk menjaga homeostasis system imun tetapi apabila jumlahnya berlebihan dapat berbahaya karena bersifat immunosupresif dan dapat melindungi keberadaan antigen. Limfosit $CD4^+CD25^+$ menjaga toleransi perifer dengan menggunakan berbagai mekanisme antiinflamasi. Peran $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ dalam meloloskan perkembangan neoplasma antara lain adalah menghambat aktivasi $CD4^+$ sebagai regulator respon imun oleh APC yang terpapar antigen neoplasma dan menghambat fungsi efektor sel T $CD8^+$.

4.4. Analisis Jumlah Total Sel B220⁺

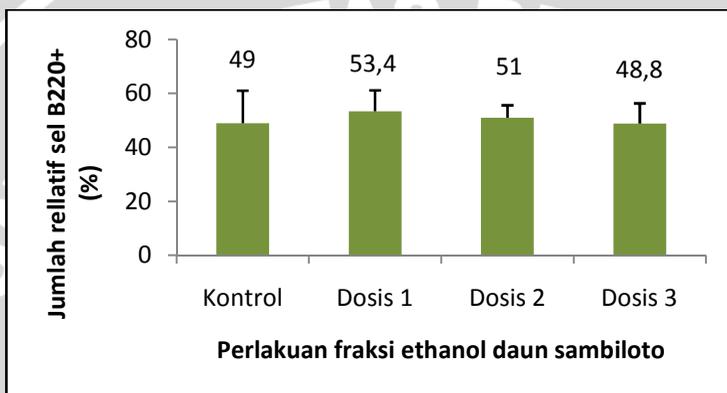
Hasil analisis Flowcytometry (Gambar 17) menunjukkan profil jumlah sel B B220⁺ dan Gr-1 yang telah diberikan perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto tidak memiliki perbedaan signifikan. Hasil analisis statistika persentase jumlah sel B B220⁺ perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto (Gambar 18) menunjukkan sel B B220⁺ pada perlakuan kontrol sebesar 49 % atau 38,62 juta sel (Lampiran 20) mengalami peningkatan jumlah sel B B220⁺ namun tidak signifikan ($p>0,05$) menjadi 53,4 % atau 42,94 juta sel (Lampiran 20) pada perlakuan Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dan Dosis 2 (0,5 mg/g BB) menjadi 51 % atau 43,21 juta sel (Lampiran 20). Sedangkan penurunan namun tidak signifikan ($p>0,05$) terjadi pada perlakuan Dosis 3 (1 mg/g BB) menjadi 48,8 % atau 38,44 juta sel (Lampiran 20)



Gambar 17. Profil persentase jumlah relatif sel B B220 dan Gr-1 hasil analisis flowcytometry pada organ *spleen*

Analisis yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto mampu meningkatkan dan menurunkan jumlah sel B B220⁺ namun tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Hal ini dikarenakan pemberian senyawa aktif dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto perlu dilakukan dalam dosis yang lebih tinggi dan waktu

perlakuan yang lebih lama, mungkin dengan begitu hasil peningkatan jumlah sel bisa terlihat lebih jelas. Namun data yang didapat cenderung mengalami peningkatan meskipun tidak signifikan. Selain menganalisis keberadaan sel T yang berperan dalam sistem imun seluler juga dilakukan analisis keberadaan B220⁺ dalam penelitian ini yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan sel B sebagai sistem imun humoral.



Gambar 18. Jumlah relatif sel B B220 pada organ *spleen* perlakuan oral Selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

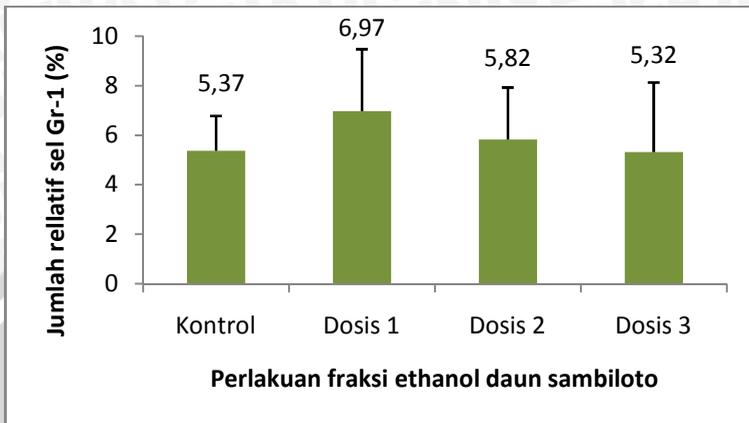
Data yang diperoleh menunjukkan pada Dosis 1 dan Dosis 2 mengalami peningkatan jumlah sel, sedangkan pada Dosis 3 mengalami penurunan jumlah sel meskipun tidak signifikan, jika dilakukan perlakuan dengan waktu yang lebih lama mungkin akan terlihat kecenderungan mengalami peningkatan jumlah sel. Pemberian perlakuan oral fraksi *ethanol* daun *sambiloto* ternyata mampu meningkatkan jumlah sel B dalam sistem imun humoral yang berperan dalam memproduksi antibodi. Penggunaan hewan coba model sehat dalam penelitian ini mungkin bisa menunjukkan bahwa data jumlah sel B tersebut masih belum mengalami aktivasi karena tidak dilakukan perlakuan infeksi terhadap hewan coba yang bisa memicu aktivasi sel B untuk memproduksi antibodi.

Sel B220⁺ (CD45R) merupakan molekul permukaan yang diekspresikan oleh sel limfosit B, subset sel T naive dan monosit yang berfungsi sebagai isoform CD45 yang memiliki ekson A (Murphy,

2008). B220⁺ memiliki peran dalam jalur perkembangan sel B yang akan mengekspresikan molekul permukaan CD45R pada sel progenitor, sumsum tulang belakang dan hati fetus, serta sel B yang teraktivasi. Pada awalnya B220 merupakan antigen leukosit yang berperan dalam aktivasi dan pematangan sel B. Sel B yang sudah teraktivasi memiliki peranan penting dalam pembentukan imunoglobulin sebagai bentuk pertahanan diri dalam melawan antigen yang masuk dalam tubuh, sel-sel tersebut di dalam sirkulasi darah mencakup 5-15 % dari jumlah sel limfosit, namun jumlah tersebut masih belum termasuk sel B prekursor yang tidak menunjukkan imunoglobulin permukaan (sIg). Pematangan sel B memiliki tingkat pematangan yang berbeda berdasarkan ada tidaknya imunoglobulin permukaan (sIg), imunoglobulin intrasitoplasmik (cIg), dan imunoglobulin lainnya (Kresno, 2001). Sel B di dalam sistem imun merupakan sel limfosit yang mampu memproduksi antibodi. Antibodi tersebut berupa senyawa protein dalam sistem imun humoral. Antibodi inilah yang mampu mencegah infeksi dan mengeliminasi berbagai bentuk antigen (Abbas, 2005). Senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto dapat meningkatkan aktivitas IL-2 yang diproduksi sel Th1 dan berperan dalam proliferasi sel limfosit. Proliferasi inilah yang mempengaruhi peningkatan aktivasi sel B (Azizah, 2011).

4.4. Analisis Jumlah Total Sel Gr-1

Analisis Gr-1 (granulocyte differentiation antigen 1) ini difokuskan untuk mengetahui keberadaan makrofag sebagai APC yang berperan mengenali suatu antigen dalam sistem imun. Hasil analisis statistika persentase jumlah Gr-1 perlakuan oral fraksi *ethanol* daun sambiloto (Gambar 19) menunjukkan sel Gr-1 pada perlakuan kontrol sebesar 5,37 % atau 4,79 juta sel (Lampiran 22) mengalami peningkatan jumlah sel B B220⁺ namun tidak signifikan ($p > 0,05$) menjadi 6,97 % atau 6,42 juta sel (Lampiran 22) pada perlakuan Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dan Dosis 2 (0,5 mg/g BB) menjadi 5,82 % atau 5,5 juta sel (Lampiran 22). Sedangkan penurunan tidak signifikan ($p > 0,05$) terjadi pada perlakuan Dosis 3 (1 mg/g BB) menjadi 5,32 % atau 4,62 juta sel (Lampiran 22)



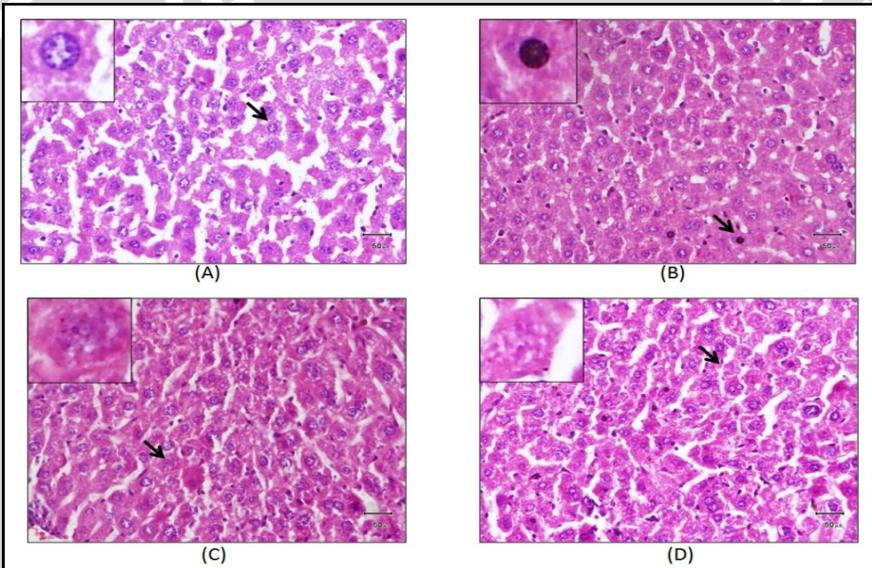
Gambar 19. Jumlah relatif Gr-1 pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Sel makrofag didistribusikan secara luas ke seluruh tubuh dalam sistem fagositik mononuklear, istilah bagi sel-sel yang sangat fagositik yang tersebar luas di seluruh tubuh terutama pada daerah yang banyak pembuluh darah. Makrofag ditemukan hampir pada seluruh organ tubuh, terutama pada jaringan ikat longgar. Makrofag berasal dari sel-sel pada sumsum tulang, dari promonosit kemudian membelah menjadi monosit dan beredar dalam darah. Pada perkembangannya monosit ini bermigrasi ke jaringan ikat, kemudian menjadi matang dan berubah menjadi makrofag. Bentuk sel-sel makrofag dalam darah adalah berupa monosit, dalam jaringan ikat longgar berupa makrofag, dalam hepar berupa sel Kupffer, dan pada susunan saraf pusat sebagai mikroglia. Makrofag memiliki fungsi atau peran utama untuk memakan partikel dan mencernanya bersama-sama dengan lisosom yaitu berkaitan dengan fungsi pertahanan dan perbaikan, fungsi lainnya adalah menghasilkan IL yang mengatur tugas sel B dan sel T dari limfosit dan memobilisasi sistem pertahanan tubuh lainnya, makrofag juga merupakan sel sekretori yang dapat menghasilkan yang dapat membunuh sel tumor, juga menghasilkan beberapa substansi penting termasuk enzim-enzim lisozim dan elastase. Sel makrofag ini terdapat sebagai makrofag bebas dan makrofag tetap. Makrofag bebas merupakan sel yang mampu bergerak bebas yang ditemukan pada jaringan interstisial berupa makrofag dan histiosit. Sedangkan makrofag tetap tidak mampu

bergerak seperti makrofag bebas yang ditemukan pada jaringan interstitial limpa, kelenjar limfe, dan dalam hepar (Baratawidjaja, 2000)

4.5. Analisis Perubahan Sel Hepar

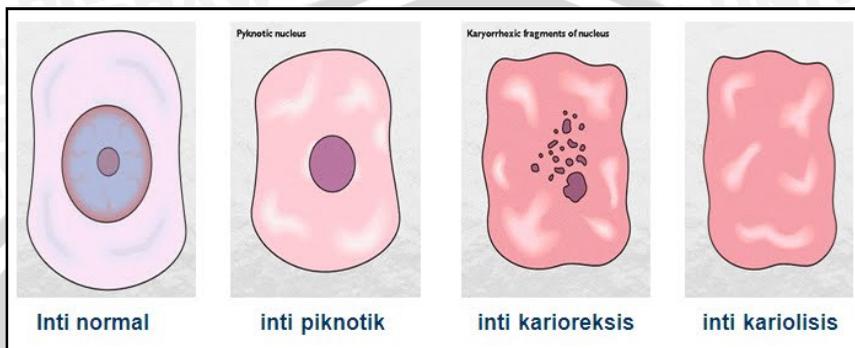
Pengamatan struktur histologi hepar menggunakan pewarnaan Hematoksin-Eosin (Gambar 20) menunjukkan perbandingan antara sel normal dan perubahan sel seperti sel piknotik, sel karioreksis, dan sel kariolisis. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui efek toksisitas fraksi *ethanol* daun sambiloto setelah diperlakukan secara oral pada hewan coba mencit.



Gambar 20. Struktur Histologi Hepar. Keterangan: (A) Sel Normal, (B) Sel Piknotik, (C) Sel Karioreksis, (D) sel Kariolisis (Perbesaran 400x, skala 50 μ m)

Suatu senyawa tertentu yang diberikan secara oral dalam tubuh akan melalui saluran cerna yang akan tersirkulasi portal hepatic dan hepar akan berperan dalam detoksifikasi senyawa yang masuk sehingga hepar akan rentan dengan pengaruh suatu zat jika zat tersebut masuk dengan jumlah yang relatif banyak. Pemasukan dosis yang besar dan dilakukan secara berkala mampu menimbulkan perubahan sel hepar yang bisa

berakibat terganggunya fungsi dan metabolisme dalam hepar (Junquera, 2005)

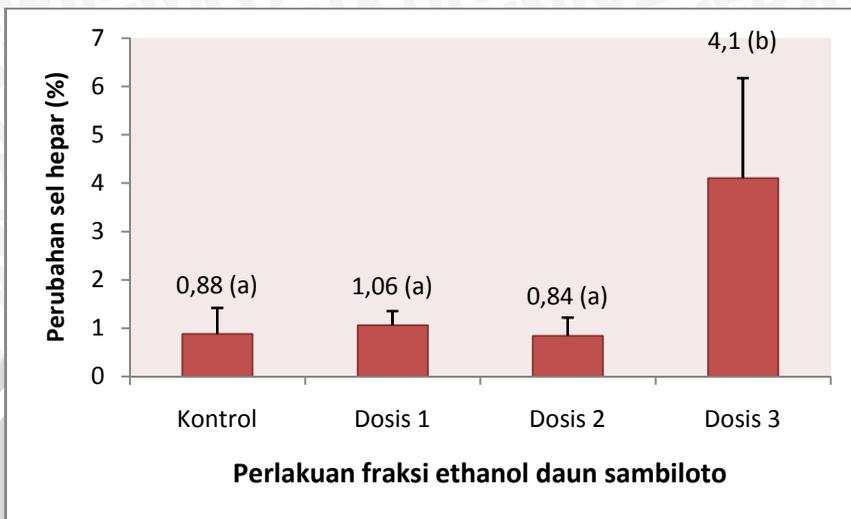


Sumber: Ngabekti, 2000

Gambar 21. Tahapan kerusakan sel hepar

Gambaran histologi hepar yang mengalami kerusakan (Gambar 21) menunjukkan contoh serangkaian perubahan sel hepar. Perubahan pada sel yang terjadi pada sitoplasma dan organel-organel sel lainnya yang meliputi sel piknotik, sel karyoreksis, dan sel kariolisis. Ciri sel piknotik yaitu inti sel yang mati akan menyusut, menjadi padat, batasnya tidak teratur dan berwarna gelap. Selanjutnya inti sel hancur dan meninggalkan pecahan-pecahan zat kromatin yang tersebar di dalam sel dan disebut sel karyoreksis. Kemudian dilanjutkan sel kariolisis yaitu inti sel yang mati akan menghilang (Lesson, 1990).

Menurut Mitaine (2001) saponin merupakan senyawa kimia yang dapat menyebabkan sel darah merah terganggu akibat dari kerusakan membran sel, menurunkan kolesterol plasma. Saponin berpengaruh terhadap permeabilitas membran sel. Peningkatan permeabilitas membran sel dapat menyebabkan cairan elektrolit di luar sel akan mudah masuk ke dalam sel, akibatnya sel akan membengkak dan mudah pecah.



Gambar 22. Persentase perubahan sel hepar perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Kerusakan sel hepar pada setiap perlakuan fraksi *ethanol* daun sambiloto (Gambar 22) menunjukkan perlakuan dosis 3 (1 mg/g BB) mengalami kerusakan sel hepar paling tinggi yaitu 4,1 % jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol sebesar 0,88 %, persentase kerusakan ini dihitung berdasarkan jenis-jenis kerusakan sel hepar yang meliputi sel piknotik, sel karioreksis, dan sel kariolisis. Kerusakan sel hepar bisa terjadi karena kandungan senyawa saponin yang terkandung dalam fraksi *ethanol* daun sambiloto. Semakin besar konsentrasi senyawa saponin yang masuk akan mempengaruhi kerja dari membran sel hepar. Senyawa saponin ini mampu masuk ke dalam sel hepar karena saponin mampu beredar dalam pembuluh darah dan nantinya akan masuk dalam hepar. Senyawa saponin memiliki sifat toksik yang mampu merusak endotel dinding pembuluh darah jika terdapat dalam konsentrasi yang besar. Rasa saponin yang pahit mampu menyebabkan hemolisis terhadap eritrosit, memiliki berat molekul yang cukup besar, mengandung senyawa gula yang bisa menyebabkan iritasi saluran pencernaan dan ketika terserap pembuluh darah akan menyebabkan kerusakan hepar (Robbins, 2004).

BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

1. Pemberian fraksi *ethanol* daun sambiloto secara oral meningkatkan jumlah sel T CD8⁺, CD4⁺CD25⁺, sel B220⁺, dan Gr-1 pada Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dan Dosis 2 (0,5 mg/g BB) namun tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol, sedangkan penurunan jumlah sel T CD4⁺, CD4⁺CD62L⁺, dan CD8⁺CD62L⁺ pada Dosis 1 (0,1 mg/g BB) dan Dosis 3 (1 mg/g BB) namun tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol.
2. Dosis optimum fraksi *ethanol* daun sambiloto dalam peningkatan sel limfosit yang aman adalah 0,1 mg/g BB.
3. Fraksi *ethanol* daun sambiloto dosis 1 mg/g BB menimbulkan efek toksik yang signifikan berdasarkan gambaran perubahan sel pada histopatologi jaringan hepar.

5.2. Saran

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan penambahan waktu perlakuan agar lebih terlihat perbedaan jumlah sel yang dianalisis dibandingkan perlakuan kontrol dan perlu dilakukan penambahan kelompok perlakuan hewan coba yang sakit agar bisa dibandingkan dengan jumlah sel hewan coba yang sehat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., dan A.H. Lichtman. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. W.B. Saunders Company. California.
- Allen, S.E. 2002. The Liver : Anatomy, Physiology, Disease and Treatment. Northeastern University
- Block, K.I. and M.N. Mead. 2003. Immune system effects of Echinacea, Ginseng and Astragalus: A review. *Integrative cancer therapies*. 2(3): 247 – 267.
- Baratawidjaya, K.G. 2000. Imunologi Dasar. Balai Penerbit. FK UI: Jakarta.
- Biosciences. 2000. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Dickinson and Company: San Jose
- Cahyaningsih U.K, Setiawan dan D.R. Ekastuti, 2003. Perbandingan Gambaran Diferensiasi Leukosit Ayam Setelah Pemberian Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) Dengan Dosis Bertingkat Dan Koksidiostat. Prosiding Seminar dan Pameran Nasional TOI XXIV. hal. 245-257.
- Dalimartha, Setiawan. 2007. 36 Resep Tumbuhan Obat untuk Menurunkan Kolesterol. Ed 13. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Decker J.M., 2000. Introduction to immunology 11 th Hour. *Blackwell Science. Inc.* p. 1-2.
- Delves, P.J., Roitt, I.M., Martin, S.J., dan Burton D. 2006. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Publishing Inc. Massachusetts.
- Deng, W.L., 1978. Preliminary Studies On The Pharmacology of The *Andrographis* Product Dihydroandrographolide Sodium Succinate. *Newsletters Of Chinese Herb Med.* 131 8: p. 26-28.
- Elfahmi, 2006. Phytochemical and Bio-synthetic Studies of Lignans with a Focus on Indonesian Medicinal Plants. Facilitas Beddrif of Gro-ningen The Netherlands. Thesis.
- Eurell, J.A.C. 2004. Veterinary Histology. Teton NewMedia. Wyoming.
- Guyton, A.C. dan Hall, J.E. 2006. Textbook of Medical Physiology, 10th Edition. W. B. Saunders Company. London.
- Harris, J. R. 1991. Blood Cell Biochemistry Volume 3 : Lymphocytes and Granulocytes. Plenum Press. New York.
- Junquera, L. and C.J. Carneiro. 2005. Basic Histology, Test and Atlas Edition 11th. McGraw-Hill. New York

- Kimball, J.W. 1990. Introduction to Immunology, 3rd Edition. Macmillan Publishing Company, Inc. New York.
- Kissane, J.M. 1985. Pathology. Volume 2. 8th edition. The C.V. Mosby Company. St.Toronto. Toronto.
- Kraal, G. 1992. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 132, 31–73.
- Kuby, J. 1992. Immunology. Freeman Company. Concord
- Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. 2004. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol* ;92(2-3):291-5.
- Kung, C., Pingel J., Heikinheimo M., Klemola T. 2000. Mutations in The Tyrosine phosphatase CD45 Genes in Child With Sever Combine Immunodeficiency Disease. *Nature Medicine.* 6(3): 343-5.
- Lee. J.H., H.H. Yu, L.C. Wang, Y.H. Yang, Y.T. Lin, dan B.L. Chiang. 2006. The level of CD4⁺CD25⁺ Regualtory T Cells In Paediatric Patients With Allergic Rhinitis and Bronchial Asthma. Departement of Pediatrics, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, China and Graduate Institute of Clinical Medicine, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan, Cina.
- Lesson. 1990. Buku Ajar Histologi. EGC Kedokteran. Jakarta
- Mahendra B, Rahmawati E. 2005. Penyembuhan Secara Aman dan Alami. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Mardiswojo. S, Harsono R 1975. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang. Karya Wacana. Jakarta.
- Mitaine AC, Marouf A, Haquei B, Bilirakis N, dan Lacaille MA, 2001. Two Triterpenoid and Saponin from *Achyranthes Bidentata*. *Chem. Pharm Bull.* (Tokyo). 49(11): 1492–1494.
- Michael, H.R. 2006. Histology A Text and Atlas 5 th Edition. Lippincott William & Wilkins. Maryland
- Murphy, Kenneth, Paul Travers, Mark Walport. 2008. Immunobiology 7 th Edition. Garland Science. New York.
- Naiyana T. 2002. Effects of *Andrographis paniculata* (Burm. F) Nees on performance, mortality, & coccidiosis in broiler chickens. Georg-August-University Gottingen, Germany. Gottingen.
- Paul, W.E. 2008. Fundamental Immunology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.

- Pimentel, J.A.A. 2010. Role of Alergen-Spesific CD8⁺ T Cells in the Murine Asthma Model. Munchen University.
- Prapanza I, Lukito AM. 2003. Khasiat dan Manfaat Sambiloto. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Puri A., Saxena R.P., Saxena K.C, Srivastava V., Tanden J.S., 1993. Immunostimulant Agent From *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod.* Jul 56 (7) : p. 995-999.
- Rhoades, R.A. dan Bell, D.R. 2009. Medical Physiology. Lippincott Williams & Wilkins. Maryland.
- Rifa'i, M. 2008. Sel Regulator. Muhaimin Site. <http://rifa12345.multiply.com>. Diakses tanggal 20 Juni 2013.
- Rohimah. 1997. Identifikasi Flavonoid yang memiliki Antifungal dari Damar (*Hopea mangarawan*) dan *Shorea leptosula* [skripsi]. Bogor. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Roitt, I.M. 1971. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications. Osney Mead, Oxford, London.
- Sastrapradja S. 1978. Tumbuhan Obat. Lembaga Tinggi Nasional. Jakarta.
- Sompayrac, L. 2003. How the Immune System Works. Blackwell Publishing. Massachusetts.
- Spelman, K., J.J. Burns, D. Nichols, N. Winters, S. Ottersberg and M. Tenborg. 2006. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: A review of herbal immunomodulators. *Alternative Med. Rev.* 11: 128 – 146.
- Sumaryono, W. 2002. Penelitian Obat Tradisional Indonesia dan Strategi Peningkatannya. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI. Surabaya. hlm. 1 – 8.
- Suntoro, S.H. 1983. Metode Pewarnaan; Histologi dan Histokimia. Bhratara Karya Aksara. Jakarta
- Susilo, 1995. Tanaman Obat Indonesia. Bhratara Karya Aksara. Jakarta
- Syamsuhidayat SS, Hutapea JR. 1991. Inventaris Tanaman Obat Indonesia (1). Badan Pengembangan dan Penelitian Kesehatan. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Tedder, T.F., D.A. Steeber, A. Chen, dan P. Engel. 1995. The Selectins: Vascular Adhesion Molecules. *FASEB J.* 9, 866–873.
- Tizard, I.R. 2000. Immunology: An Introduction. 6th Ed. Saunders College Publishing. New York.

- Thompson, C. And Fiona P. 2004. Regulatory T Cells. Sir William Dunn School of Pathology. University of Oxford.
- Wahyuni, N. 2009. Perubahan Kadar Interleukin-2, Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺, dan Histopatologi Usus Halus Mencit (BALB/c) Splenectomy Paparan Salmonella typhi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
- Weissman, I.L., Hood L.E., dan Wood, W.B. 1978. Essential Concepts in Immunology. The Benjamin Cummings Publishing Co. Inc. California.
- West G., 1995. Blacks Veterinary Dictionary 18 th Edition. A and C Black London. London
- Wibudi A. 2006. Mekanisme Kerja Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Sebagai Anti Diabetes. [disertasi]. Sekolah Pasca Sarjana IPB: Bogor.
- Yin J. Dan L. Guo, 1993. Contemporary traditional Chinese Medicine. Beijing, Xie Yuan.
- Yulinah, Ellin dkk. 2001. Aktivitas Anti Diabetika Fraksi Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). *Jurnal Sainika*. 6 No.1, 13-20.
- Yusron M., M. Januwati dan W.J. Priambodo, 2004. Keragaan mutu Simplisia Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) Pada Beberapa Kondisi Agroekologi. Prosiding Seminar Kelompok Kerja Nasional (Pokjanas) Tanaman Obat Indonesia di Tawangmangu, 27-28 April 2004.

LAMPIRAN

Lampiran 1.Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 158-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : UJI AKTIFITAS BIOLOGIS EKSTRAK ETHANOL DAUN
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) TERHADAP
PERUBAHAN KUANTITATIF SEL T DAN SEL B PADA
MENCIT BALB/C (*Mus musculus*)

PENELITI : UWAIS AL QARNI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

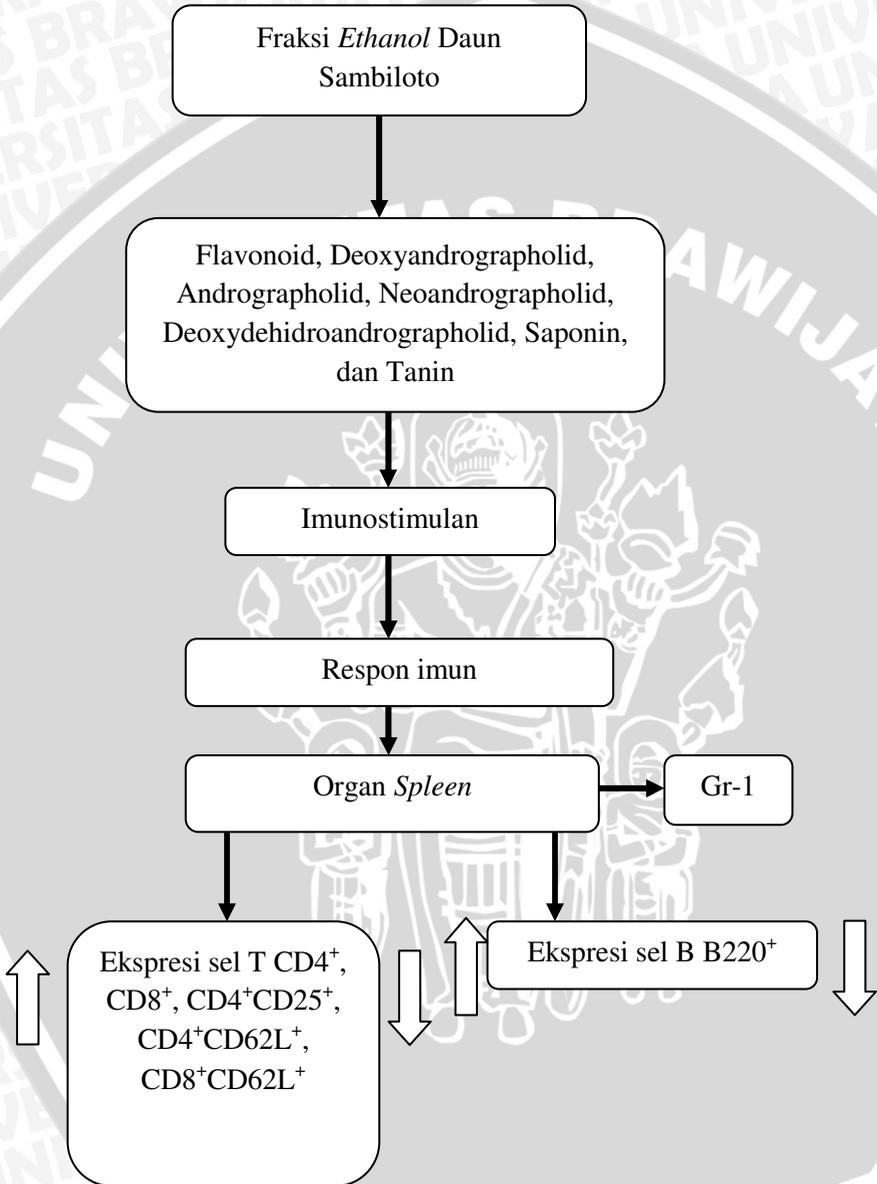
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 16 Juni 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

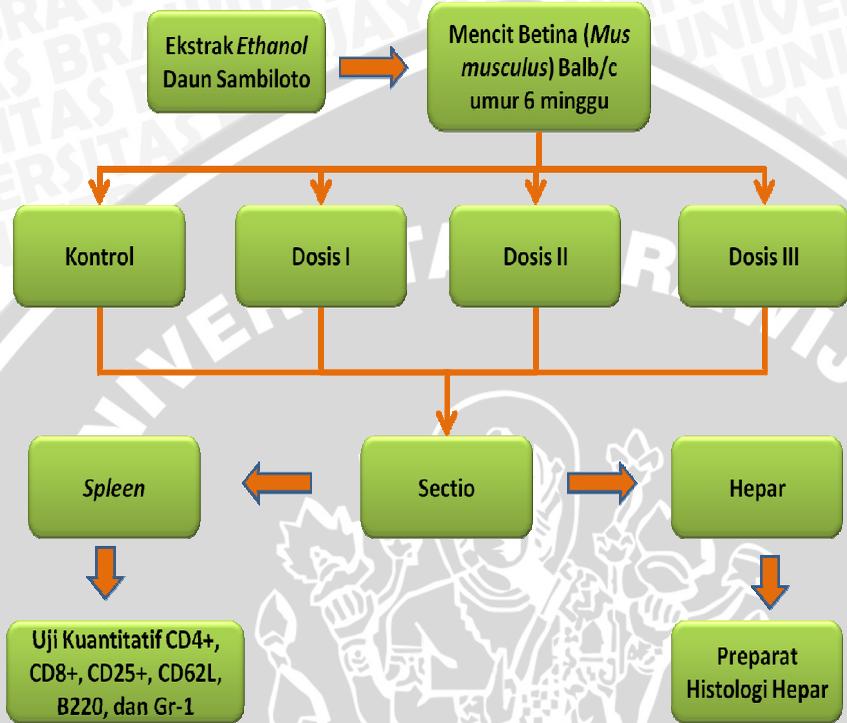


Prof. Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Kerangka Konsep



Lampiran 3. Kerangka Operasional



Lampiran 4. Pembuatan Fraksi *Ethanol* Daun Sambilotto

Daun Sambilotto (*Andrographis paniculata* Nees)

- Diambil bagian daun yang tidak terlalu tua
- Dicuci bersih menggunakan air
- Dioven suhu 37°C sampai daun kering
- Daun kering ditumbuk
- Dimasukkan dalam maserator dengan pelarut *ethanol* 95% selama 24 jam
- Hasil maserasi dioven suhu 60°C sampai berbentuk pasta

Pasta Fraksi Daun Sambilotto

- Dilarutkan akuades untuk larutan stok masing-masing dosis

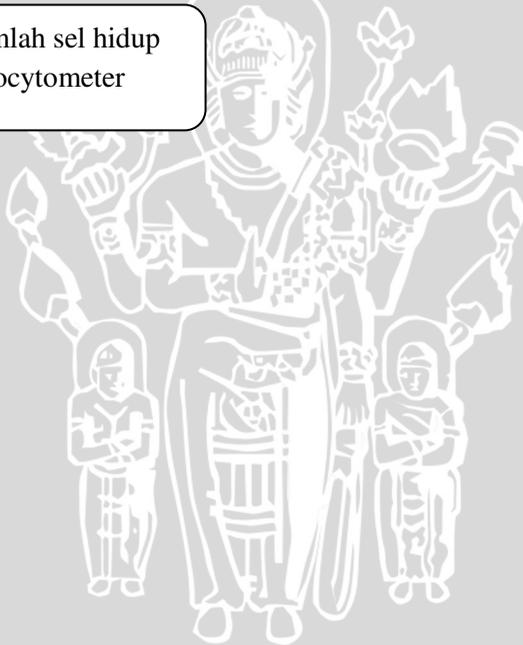
Larutan stok 400 mg/100 ml (dosis I), 2 g/100 ml (dosis II), dan 4 g/100 ml (dosis III)

Lampiran 5. Isolasi *Spleen* dan Penghitungan Sel

Organ *Spleen*

- Diambil dari mencit yang sudah dibedah
- Dicuci dalam PBS
- Digerus dengan pangkal spuit pada cawan berisi PBS
- Disaring dengan wire
- Dimasukkan tabung sentrifuse
- Ditambahkan PBS hingga 12 ml
- Disentrifuse 2500 rpm, 5 menit, 4°C
- Didapatkan pelet yang diresuspendi 1ml PBS
- Diambil sebanyak 5 µl ditambah 95 µl Evan's Blue

Penghitungan jumlah sel hidup
dengan Haemocytometer



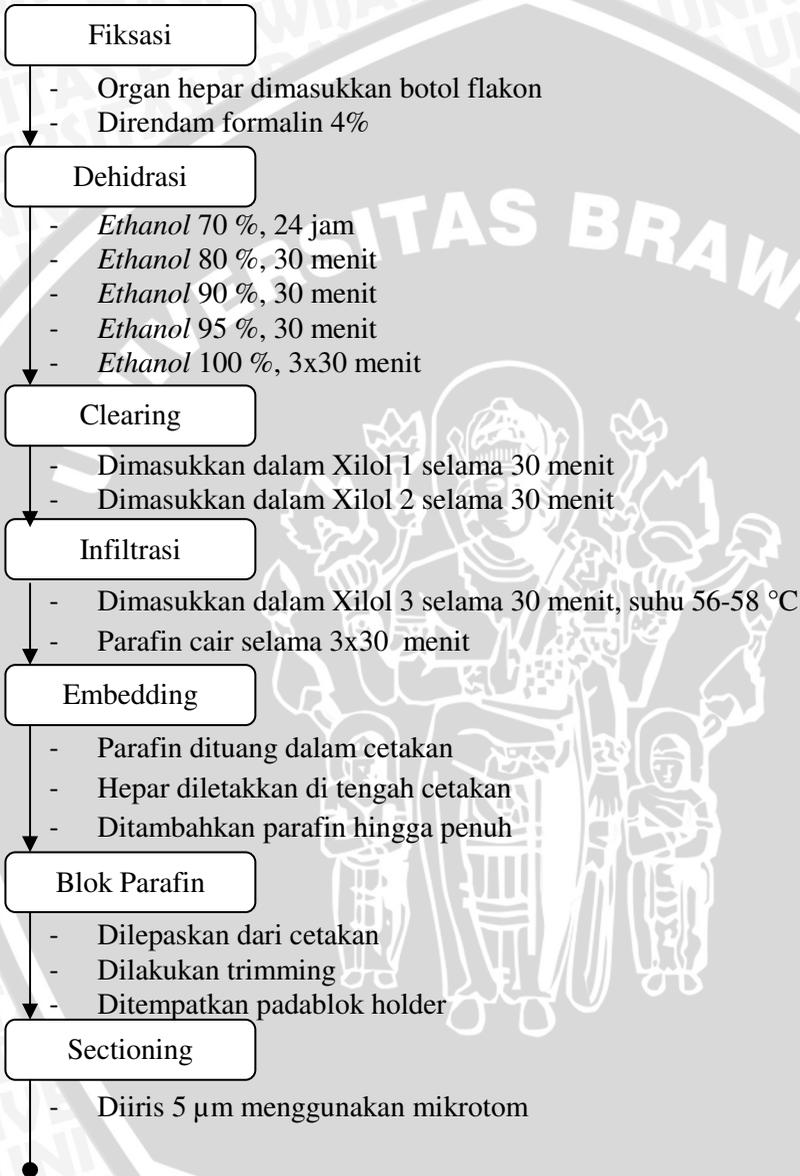
Lampiran 6. Analisa Flowcytometry

Pelet 100 µl

- Diresuspensi 500 µl PBS dalam microtube
- Disentrifuse 2500 rpm, 5 menit, 4°C
- Ditambahkan 50 µl antibodi anti CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD62L⁺, CD8⁺CD62L⁺, CD4⁺CD25⁺, B220, dan Gr-1 *antimouse*
- Dipipetting hingga homogen
- Diinkubasi dalam ice box
- Diresuspensi 300 µl PBS dalam cuvet *flowcytometry*
- Dilakukan setting komputer dengan software BD Cell Quest ProTM
- Dipasangkan cuvet pada *nozzle BD Biosciences FACSCaliburTM flowcytometry*.
- Dilakukan koneksi komputer dengan *flowcytometry*
- Dilakukan running sampel dalam *nozzle flowcytometry*

Data Analisis
Flowcytometry

Lampiran 7. Pembuatan Preparat Hepar Pewarnaan HE



Hasil Irisan

- Diambil menggunakan kuas kecil
- Diletakkan dalam air hangat suhu 38-40 °C dalam water bath
- Diambil menggunakan gelas obyek
- Diletakkan di atas hot plate hingga kering

Deparafinasi

- Dimasukkan dalam Xilol selama 2x30 menit
- Direhidrasi *ethanol* 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 30% masing-masing 5 menit
- Dicuci akuades mengalir selama 5 menit

Hematoksilin

- Direndam dalam hematoksilin selama 10 detik
- Dicuci akuades mengalir selama 5 menit
- Direndam *ethanol* 30%, 60%, 70% masing-masing 5 menit

Eosin

- Direndam dalam eosin selama 10 menit
- Direndam *ethanol* 30%, 60%, 70% masing-masing 5 menit
- Diclearing dengan Xilol selama 3x5 menit
- Dimounting dengan enthelan

Preparat Histologi Hepar

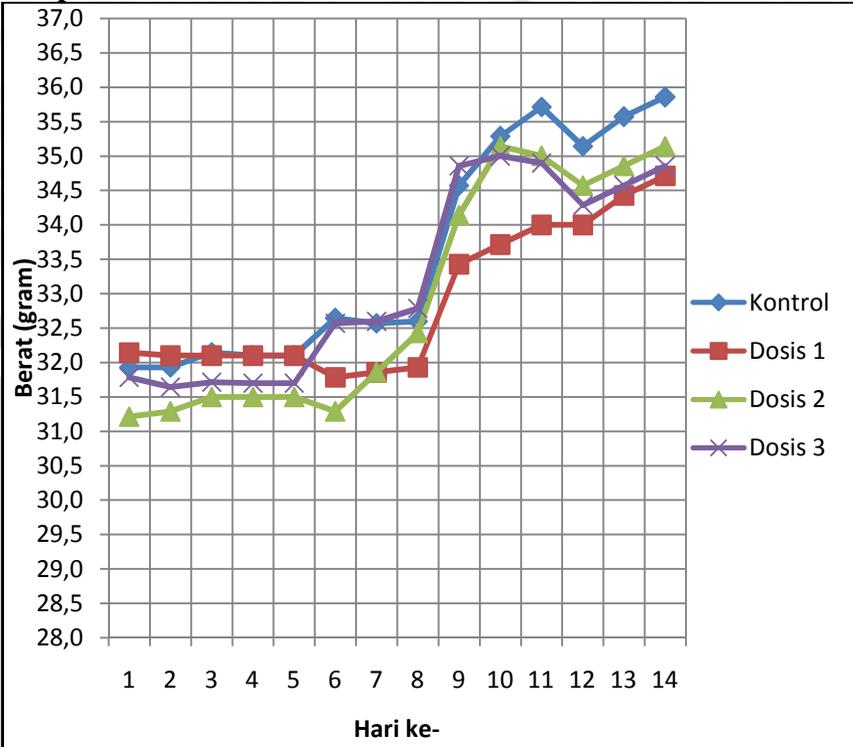
Lampiran 8. Penghitungan Dosis Sonde

Tabel 2. Penghitungan dosis sonde

berat (g)	dosis 1 (0,1 mg/g) (ml)	dosis 2 (0,5 mg/g) (ml)	dosis 3 (1 mg/g) (ml)
15	0,375	0,375	0,375
15,5	0,3875	0,3875	0,3875
16	0,4	0,4	0,4
16,5	0,4125	0,4125	0,4125
17	0,425	0,425	0,425
17,5	0,4375	0,4375	0,4375
18	0,45	0,45	0,45
18,5	0,4625	0,4625	0,4625
19	0,475	0,475	0,475
19,5	0,4875	0,4875	0,4875
20	0,5	0,5	0,5
20,5	0,5125	0,5125	0,5125
21	0,525	0,525	0,525
21,5	0,5375	0,5375	0,5375
22	0,55	0,55	0,55
22,5	0,5625	0,5625	0,5625
23	0,575	0,575	0,575
23,5	0,5875	0,5875	0,5875
24	0,6	0,6	0,6
24,5	0,6125	0,6125	0,6125
25	0,625	0,625	0,625
25,5	0,6375	0,6375	0,6375
26	0,65	0,65	0,65
26,5	0,6625	0,6625	0,6625
27	0,675	0,675	0,675
27,5	0,6875	0,6875	0,6875
28	0,7	0,7	0,7
28,5	0,7125	0,7125	0,7125
29	0,725	0,725	0,725
29,5	0,7375	0,7375	0,7375
30	0,75	0,75	0,75
30,5	0,7625	0,7625	0,7625

31	0,775	0,775	0,775
31,5	0,7875	0,7875	0,7875
32	0,8	0,8	0,8
32,5	0,8125	0,8125	0,8125
33	0,825	0,825	0,825
33,5	0,8375	0,8375	0,8375
34	0,85	0,85	0,85
34,5	0,8625	0,8625	0,8625
35	0,875	0,875	0,875
35,5	0,8875	0,8875	0,8875
36	0,9	0,9	0,9
36,5	0,9125	0,9125	0,9125
37	0,925	0,925	0,925
37,5	0,9375	0,9375	0,9375
38	0,95	0,95	0,95
38,5	0,9625	0,9625	0,9625
39	0,975	0,975	0,975
39,5	0,9875	0,9875	0,9875
40	1	1	1

Lampiran 9. Berat Badan Mencit Perlakuan



Gambar 23. Berat badan mencit. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Lampiran 10. Hasil Perhitungan Haemocymeter

Tabel 3. Hasil perhitungan sel menggunakan Haemocytometer

Perlakuan	Ulangan	Jumlah Sel Pengamatan	Jumlah Sel
Kontrol	1	306	76500000
	2	422	105500000
	3	381	95250000
	4	320	80000000
	5	374	93500000
Dosis 1	1	307	76750000
	2	408	102000000
	3	388	97000000
	4	411	102750000
	5	325	81250000
Dosis 2	1	415	103750000
	2	389	97250000
	3	312	78000000
	4	366	91500000
	5	421	105250000
Dosis 3	1	378	94500000
	2	325	81250000
	3	369	92250000
	4	366	91500000
	5	310	77500000

Lampiran 11. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif CD4⁺ dan CD8⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows

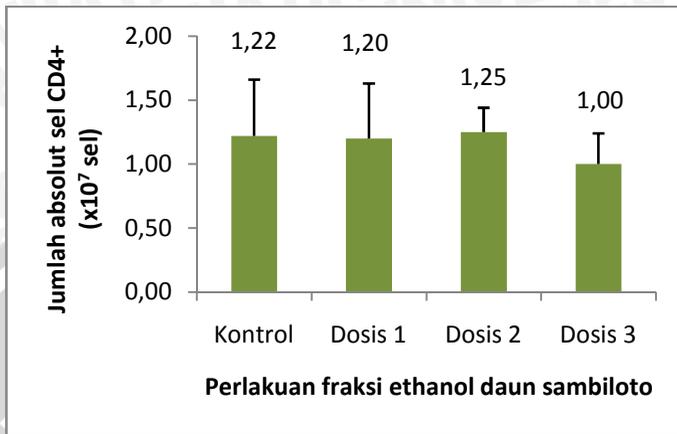
Tabel 4. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	12.950	3	4.317	.378	.770
	Within Groups	182.800	16	11.425		
	Total	195.750	19			
CD8	Between Groups	13.750	3	4.583	1.078	.386
	Within Groups	68.000	16	4.250		
	Total	81.750	19			

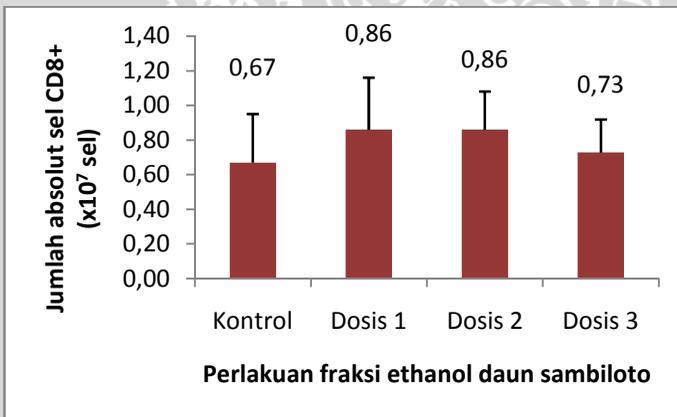
Lampiran 12. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD4⁺ dan CD8⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 5. Hasil uji ANOVA jumlah absolut sel T CD4⁺ dan CD8⁺

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	1.841E13	3	6.137E12	.511	.680
	Within Groups	1.920E14	16	1.200E13		
	Total	2.104E14	19			
CD8	Between Groups	1.388E13	3	4.628E12	.711	.560
	Within Groups	1.042E14	16	6.511E12		
	Total	1.181E14	19			



Gambar 24. Jumlah absolut sel T CD4⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB



Gambar 25. Jumlah absolut sel T CD8⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

**Lampiran 13. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif CD4⁺CD62L⁺
Melalui Software SPSS 16 for Windows**

Tabel 6. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4⁺CD62L⁺

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	848.550	3	282.850	4.062	.025
	Within Groups	1114.000	16	69.625		
	Total	1962.550	19			
CD4CD62L	Between Groups	833.200	3	277.733	3.905	.029
	Within Groups	1138.000	16	71.125		
	Total	1971.200	19			

Tabel 7. Hasil uji Tukey jumlah relatif sel T CD4⁺CD62L⁺

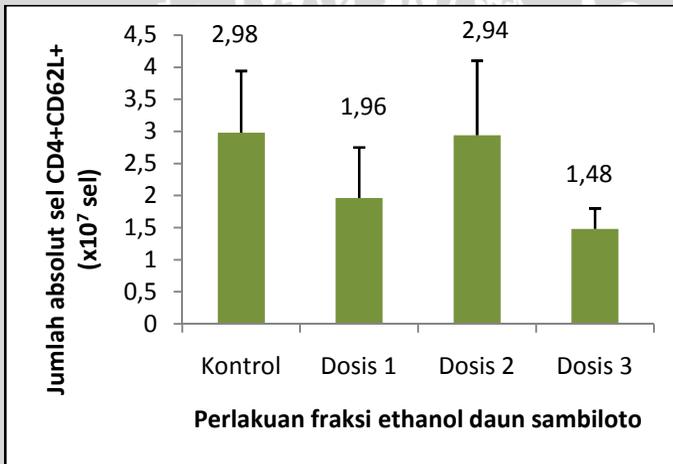
		CD4CD62L		
	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	Dosis 3	5	16.000	
	Dosis 1	5	19.000	19.000
	Dosis 2	5	28.800	28.800
	Kontrol	5		31.400
	Sig.			.117

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 14. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD4⁺CD62L⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 8. Hasil uji ANOVA jumlah absolut sel T CD4⁺CD62L⁺
ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	5.127E14	3	1.709E14	1.325	.301
	Within Groups	2.063E15	16	1.289E14		
	Total	2.576E15	19			
CD4CD62L	Between Groups	8.205E14	3	2.735E14	3.633	.036
	Within Groups	1.205E15	16	7.529E13		
	Total	2.025E15	19			



Gambar 26. Jumlah absolut sel T CD4⁺CD62L⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

**Lampiran 15. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif CD8⁺CD62L⁺
Melalui Software SPSS 16 for Windows**

Tabel 9. Hasil uji ANOVA untuk jumlah relatif Sel T CD8⁺CD62L⁺

ANOVA

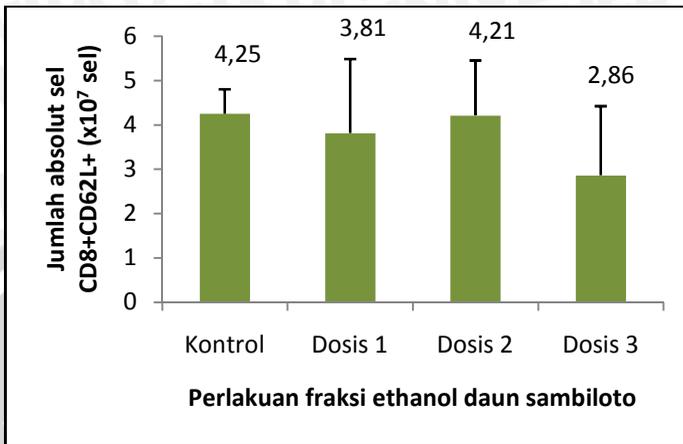
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD8	Between Groups	642.550	3	214.183	1.175	.350
	Within Groups	2916.000	16	182.250		
	Total	3558.550	19			
CD8CD62L	Between Groups	648.400	3	216.133	1.187	.346
	Within Groups	2912.800	16	182.050		
	Total	3561.200	19			

Lampiran 16. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD8⁺CD62L⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 10. Hasil uji ANOVA jumlah absolut Sel T CD8⁺CD62L⁺

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD8	Between Groups	3.159E14	3	1.053E14	.752	.537
	Within Groups	2.240E15	16	1.400E14		
	Total	2.556E15	19			
CD8CD62L	Between Groups	6.328E14	3	2.109E14	1.186	.347
	Within Groups	2.847E15	16	1.779E14		
	Total	3.480E15	19			



Gambar 27. Jumlah absolut sel T CD8⁺CD62L⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Lampiran 17. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif Sel CD4⁺CD25⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows

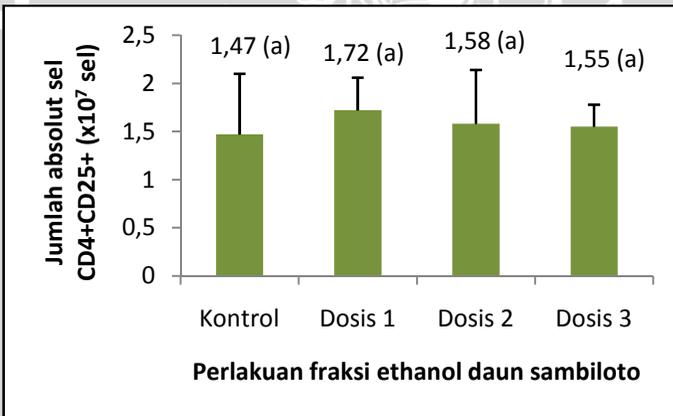
Tabel 11. Hasil uji ANOVA jumlah relatif Sel T CD4⁺CD25⁺

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	11.800	3	3.933	.222	.880
	Within Groups	284.000	16	17.750		
	Total	295.800	19			
CD4CD25	Between Groups	12.550	3	4.183	.240	.867
	Within Groups	278.400	16	17.400		
	Total	290.950	19			

Lampiran 18. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut CD4⁺CD25⁺ Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 12. Hasil uji ANOVA jumlah absolut sel T CD4⁺CD25⁺

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	1.430E14	3	4.767E13	.640	.600
	Within Groups	1.192E15	16	7.449E13		
	Total	1.335E15	19			
CD4CD25	Between Groups	1.610E13	3	5.366E12	.240	.867
	Within Groups	3.570E14	16	2.231E13		
	Total	3.731E14	19			



Gambar 28. Jumlah absolut sel T CD4⁺CD25⁺ pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Lampiran 19. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif B220 Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 13. Hasil uji ANOVA jumlah relatif B220

ANOVA

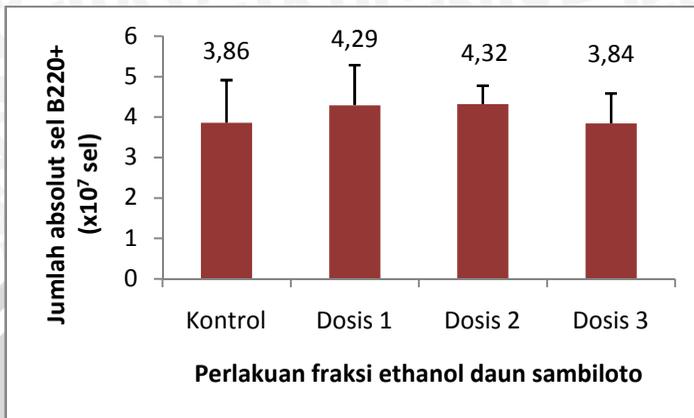
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
B220	Between Groups	68.950	3	22.983	.322	.809
	Within Groups	1142.000	16	71.375		
	Total	1210.950	19			

Lampiran 20. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut B220 Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 14. Hasil uji ANOVA jumlah absolut B220

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
B220	Between Groups	1.035E14	3	3.451E13	.482	.699
	Within Groups	1.145E15	16	7.153E13		
	Total	1.248E15	19			



Gambar 29. Jumlah absolut sel B B220 pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Lampiran 21. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif Gr1 Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 15. Hasil uji ANOVA jumlah relatif Gr-1

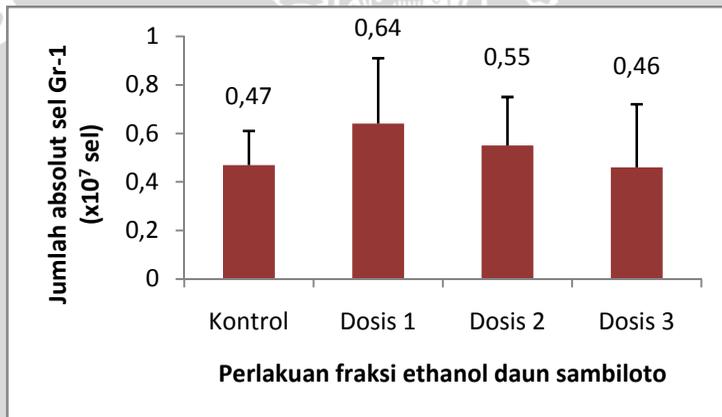
ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
B220	Between Groups	68.950	3	22.983	.322	.809
	Within Groups	1142.000	16	71.375		
	Total	1210.950	19			
Gr1	Between Groups	.550	3	.183	.282	.838
	Within Groups	10.400	16	.650		
	Total	10.950	19			

Lampiran 22. Hasil Analisis Statistika Jumlah Absolut Gr1 Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 16. Hasil uji ANOVA jumlah absolut Gr-1

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
B220	Between Groups	1.035E14	3	3.451E13	.482	.699
	Within Groups	1.145E15	16	7.153E13		
	Total	1.248E15	19			
Gr1	Between Groups	2.755E12	3	9.185E11	.713	.558
	Within Groups	2.060E13	16	1.287E12		
	Total	2.335E13	19			



Gambar 30. Jumlah absolut Gr-1 pada organ *spleen* perlakuan oral selama 2 minggu. Keterangan : Kontrol = tanpa perlakuan dosis; Dosis 1 = 0,1 mg/g BB; Dosis 2 = 0,5 mg/g BB; Dosis 3 = 1 mg/g BB

Lampiran 23. Hasil Analisis Statistika Perubahan Sel Hepar Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 17. Hasil uji ANOVA perubahan sel hepar

ANOVA					
Kerusakan sel					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37.900	3	12.633	10.499	.000
Within Groups	19.252	16	1.203		
Total	57.152	19			

Tabel 18. Hasil uji Tukey perubahan sel hepar

Kerusakan sel				
	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	Dosis 2	5	.840	
	Kontrol	5	.880	
	Dosis 1	5	1.060	
	Dosis 3	5		4.100
	Sig.		.989	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.