

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber*) DAN KATUK (*Sauropus androgynus*)
PADA SEL HEMATOPOIETIK MENCIT BALB/C BUNTING
YANG TERINFEKSI *Escherichia coli***

SKRIPSI

oleh
NURHAYATI
145090101111002



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber*) DAN KATUK (*Sauropus androgynus*)
PADA SEL HEMATOPOIETIK MENCIT BALB/C BUNTING
YANG TERINFEKSI *Escherichia coli***

SKRIPSI

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

oleh
NURHAYATI
145090101111002



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber*) DAN KATUK (*Sauropus androgynus*)
PADA SEL HEMATOPOIETIK MENCIT BALB/C BUNTING
YANG TERINFEKSI *Escherichia coli*****NURHAYATI
145090101111002**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 9 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Prof. Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS
NIP 19610304 199403 1 001

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D.
NIP 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurhayati
NIM : 145090101111002
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul : Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber*) dan Katuk (*Sauropus androgynus*) pada Sel Hematopoietik Mencit BALB/c bunting yang Terinfeksi *Escherichia coli*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 23 Juli 2018
Yang Menyatakan

Nurhayati
145090101111002

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 pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber*) dan Katuk (*Sauropus androgynus*) pada Sel Hematopoietik Mencit Balb/C Bunting yang Terinfeksi *Escherichia coli*

Nurhayati, M. Sasmito Djati

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya

2018

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh kombinasi ekstrak daun tapak liman (*E. scaber*) dan katuk (*S. androgynus*) terhadap sel hematopoietik mencit BALB/c bunting setelah infeksi *E. coli*. Penelitian terdiri dari 8 kelompok perlakuan dan 3 ulangan, yaitu K+ (kontrol sakit), K- (Kontrol sehat), P1 (infeksi + tapak liman 100%), P2 (infeksi + 75:25% tapak liman dan katuk), P3 (infeksi + 50:50% tapak liman dan katuk), P4 (infeksi + 25: 75% tapak liman dan katuk), P5 (infeksi + katuk 100%), P6 (tanpa infeksi + 50:50% tapak liman dan katuk). Mencit dikawinkan dalam kondisi estrus. Kombinasi ekstrak diberikan secara *oral gavage* pada hari ke-1 hingga ke-4 kebuntingan. Mencit diinfeksi *E. coli* 10^7 CFU/ml dalam 0,1 ml secara intraperitoneal pada hari ke-5 kebuntingan. Kombinasi ekstrak diberikan hingga hari pembedahan. Pembedahan *bone marrow* dilakukan pada hari ke-8 dan hari ke-16 kebuntingan. Sel hematopoietik diisolasi dengan cara *flushing out*. Sel diwarnai dengan antibodi spesifik dan dianalisis dengan *flowcytometri*. Data lalu dianalisis dengan *two-way ANOVA* dengan taraf signifikan 95%. dengan uji lanjut *tukey test*. Hasil menunjukkan kombinasi ekstrak belum mampu meningkatkan ekspresi sel GR1⁺. Kelompok P1 (tapak liman 100%) berpengaruh di hari ke-16 kebuntingan pada sel TER119⁺VLA4⁺. Kelompok P5 (katuk 100%) meningkatkan sel B220⁺SDF-1⁺ pada hari ke-8 kebuntingan serta sel TER119⁺CD34⁺ pada hari ke-16 kebuntingan.

Kata kunci: *bone marrow*, *E. coli*, *E. scaber*, *S. androgynus*, sel hematopoietik

repository.ub.ac.id

The Effectivity of *Elephantopus scaber* Ethanol Extract and *Sauropus androgynus* on Hematopoietic Of Balb/C Pregnant Mice that Infected by *E. coli*

Nurhayati, M. Sasmito Djati

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

2018

ABSTRACT

The aim of this research is to analyze the influence of the combination of tapak liman extract (*E. scaber*) katuk extract (*S. androgynus*) to hematopoietic cells of BALB/c pregnant mice after *E. coli* infection.. The study consisted of 8 treatment groups with 3 replications, K+ (Sick control), K- (healthy control), P1 (infection + tapak liman 100%), P2 (infection + 75:25% tapak liman and katuk), P3 (infection + 50:50% tapak liman and katuk), P4 (infection + 25:75% tapak liman and katuk), P5 (infection + katuk 100%), P6 (without infection + 50:50% tapak liman and katuk). Mice mated in estrus condition. The combination of extracts was administered on oral gavage on day 1 to 4 days of pregnancy. Mice were then infected with *E. coli* of 10^7 CFU / ml in 0.1 ml by intraperitoneally on the 5th day of pregnancy. The extract combination was given back until dissection. Bone marrow dissection is performed on, 8th, and 16th days of pregnancy. The hematopoietic cells were isolated by flushing out the bone marrow. Cells were then stained with specific antibodies and analyzed with flowcytometry. The data were then analyzed by two-way ANOVA with a significant level of 95% and then tested by tukey test. The results show that the combination of extracts has not been able to increase the expression of GR1⁺ cells. The P1 group (100% of tapak liman) had an effect on the 16th day of pregnancy on TER119⁺VLA4⁺ cells. The P5 group (100% of katuk) increased B220⁺SDF-1⁺ cells on the 8th day of pregnancy and TER119⁺CD34⁺ cells on the 16th day of pregnancy.

Key Word: *bone marrow*, *E. coli*, *E. scaber*, hematopoietic cells, *S. androgynus*

KATA PENGANTAR

Segala Puji Kehadirat Allah SWT karena atas berkat petunjuk dan rahmatnya penulis bisa menyelesaikan penulisan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dibidang biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Penyelesaian skripsi ini banyak mendapatkan bimbingan, arahan dan bantuan dari beberapa pihak, karena itu pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan dan motivasi yang sangat membantu dalam penelitian dan penulisan skripsi penulis.
2. Bapak Prof. Muhaimin Rifa'i, PhD.Med.Sc dan Bapak Drs. Aris Soewondo, M.Sielaku Dosen Penguji yang banyak memberikan saran yang bermanfaat dalam perbaikan penyusunan naskah skripsi.
3. Orang Tua Penulis, Achmad Fauzi dan Mukarromah serta keluarga besar yang senantiasa memberikan doa, dukungan, serta semangat yang sangat berarti.
4. Supervisor penelitian, Yuyun Ika Chritiana serta rekan satu proyek Meyla Restia Diana, Eka N., Faradisa N., Nida A yang dengan sabar membantu dan memberikan motivasi dalam penelitian serta penyusunan skripsi ini.
5. Rekan-rekan Laboratorium Fisiologi hewan yang banyak membantu dan memberikan dukungan dalam penelitian ini
6. Teman-Teman Biologi angkatan 2014 (AMINO)

Penulis sadar bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna sehingga semoga adanya saran dan kritik yang membangun dapat menjadikan skripsi ini menjadi karya yang semakin baik dan bermanfaat.

Malang, 23 Juli 2018
Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Hematopoiesis	4
2.2 Eritropoiesis	6
2.3 Leukopoiesis	7
2.4 Hubungan Inflamasi oleh <i>E. coli</i> dengan Sistem Hematopoietik	9
2.5 Tapak Liman (<i>Elephantopus scaber</i> , Linn)	10
2.5.1 Deskripsi Umum dan Klasifikasi	10
2.5.2 Kandungan Senyawa Kimia	12
2.6 Katuk (<i>Sauropus androgynus</i> , L.Merr)	13
2.6.1 Deskripsi Umum dan Klasifikasi	13
2.6.2 Kandungan Senyawa Kimia	15
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2 Rancangan Penelitian	16
3.3 Deskripsi hewan coba	16
3.4 Pembuntingan Hewan Coba	17
3.5 Ekstraksi Daun Tapak Liman (<i>Elephantopus scaber</i>) dan Daun Katuk (<i>Sauropus androgynus</i>)	17
3.6 Preparasi (<i>Escherichia coli</i>)	18



3.7 Pemberian Perlakuan.....	18
3.8 Uji Konfirmasi <i>E. coli</i>	19
3.9 Isolasi Sel-Sel <i>Bone Marrow</i>	20
3.10 Pewarnaan Antibodi.....	21
3.11 Analisis <i>Flowcytometry</i>	21
3.12 Analisis data	22
3.13 Rancangan Penelitian	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi Sel GR1 ⁺	23
4.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi Sel TER 119 ⁺ VLA4 ⁺	25
4.3 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi TER119 ⁺ CD34 ⁺	27
4.4 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi B220 ⁺ SDF-1 ⁺	28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan.....	31
5.1 Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	38



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Kelompok perlakuan	19



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Proses hierarkis hematopoiesis	5
2	Proses eritropoiesis	6
3	Tahap perkembangan sel leukosit	9
4	Bentuk daun tapak liman (<i>E. scaber</i>)	12
5	Bentuk daun katuk (<i>S.androgynus</i>)	14
6	Jumlah relatif GR1 ⁺ pada <i>bone marrow</i> di hari ke-8 dan ke 16 kebuntingan	24
7	Jumlah relatif TER119 ⁺ VLA4 pada <i>bone marrow</i> di hari ke-8 dan ke 16 kebuntingan	26
8	Tahapan perkembangan dan diferensiasi erithroid	27
9	Jumlah relatif TER119 ⁺ CD34 ⁺ pada <i>bone marrow</i> di hari ke-8 dan ke 16 kebuntingan	28
10	Jumlah Relatif B220 ⁺ SDF-1 ⁺ pada <i>bone marrow</i>	29



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	<i>Ethical clearence</i>	38
2	Kunci determinasi tapak liman (<i>E. scaber</i>) ...	39
3	Kunci determinasi katuk (<i>S. androgynus</i>)	40
4	Perhitungan stok dosis	41
5	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel GR1 ⁺ pada hari ke-8 kebuntingan	44
6	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel GR1 ⁺ pada hari ke-16 kebuntingan.....	45
7	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel TER119 ⁺ VLA4 ⁺ pada hari ke-8 kebuntingan	46
8	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel TER119 ⁺ VLA4 ⁺ pada hari ke-16 kebuntingan	47
9	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel B220 ⁺ SDF-1 ⁺ pada hari ke-8 kebuntingan	48
10	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel B220 ⁺ SDF-1 ⁺ pada hari ke-16 kebuntingan	49
11	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel TER119 ⁺ CD34 ⁺ pada hari ke-8 kebuntingan	50
12	Hasil <i>flowcytometry</i> jumlah relatif sel yang mengekspresikan sel TER119 ⁺ CD34 ⁺ pada hari ke-16 kebuntingan	51
13	Hasil uji statistik SPSS jumlah relatif sel GR1 ⁺ pada <i>bone marrow</i>	52
14	Hasil uji statistik spss jumlah relatif sel TER119 ⁺ VLA4 ⁺ pada <i>bone marrow</i>	56
15	Hasil uji statistik spss jumlah relatif sel B220 ⁺ SDF-1 ⁺ pada <i>bone marrow</i>	60
16	Hasil uji statistik spss jumlah relatif sel	

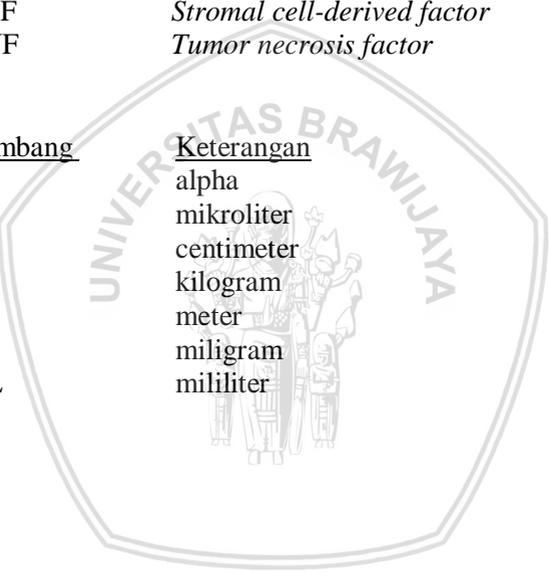




DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolisakarida
NB	Nutrien broth
NF-kB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
Rpm	Rotasi per menit
SDF	<i>Stromal cell-derived factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

<u>Lambang</u>	<u>Keterangan</u>
α	alpha
μL	mikroliter
cm	centimeter
kg	kilogram
m	meter
mg	miligram
mL	mililiter



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sistem imun merupakan komponen yang sangat penting untuk mempertahankan diri dari suatu infeksi dan penyakit. Setiap individu akan mengembangkan strategi untuk mempertahankan diri dari adanya paparan agen asing di dalam tubuhnya. Strategi tersebut juga dikembangkan oleh wanita yang sedang hamil. Sistem imun dan kondisi fisiologis ibu hamil akan mengalami perubahan selama kehamilannya (Jamieson dkk., 2006). Perubahan imunologis dari ibu hamil diperlukan untuk mendukung kehidupan bayi yang berada dalam kandungannya, akan tetapi perubahan fisiologis tersebut menyebabkan ibu hamil lebih rentan terinfeksi suatu penyakit (Robinson & Klein, 2012).

Bakteri merupakan salah satu agen penginfeksi yang bisa menyebabkan berbagai penyakit, salah satunya ialah bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *E. coli* merupakan jenis bakteri gram negatif yang bersimbiosis di usus manusia. Bakteri ini bersifat menguntungkan untuk sistem pencernaan, akan tetapi ada beberapa jenis koloni *E. coli* yang memiliki sifat virulensi. Sifat virulensi tersebut bisa menyebabkan infeksi serta penyakit tertentu (Kaper dkk., 2004). Beberapa kondisi yang diakibatkan oleh adanya infeksi bakteri pada kehamilan antara lain terjadinya aborsi, berat badan yang rendah pada bayi, anemia pada ibu, hipertensi, persalinan prematur, flebitis, serta trombosis (Parveen dkk., 2011).

Bakteri *E. coli* memiliki suatu komponen yang menjadi faktor penting dalam menginfeksi inangnya. Komponen tersebut merupakan liposakarida (LPS) yang teletak di bagian teluar dari sel membran bakteri (Beaty dkk., 1994). Komponen LPS tersebut berperan dalam mengaktifkan sel fagosit, seperti monosit dan makrofag. Sel yang mengalami aktivasi tersebut kemudian akan mensekresikan sitokin proinflamasi. Beberapa jenis sitokin proinflamasi diantaranya ialah TNF- α , IL-6, IL-1 β (Soromou dkk., 2012).

Produksi sitokin proinflamasi akan menyebabkan kondisi inflamasi. Kondisi tersebut akan mempengaruhi berbagai proses fisiologis seperti hematopoiesis. Hematopoiesis merupakan proses

yang sangat penting untuk pembentukan berbagai jenis sel darah. Proses ini terjadi di sumsum tulang (*bone marrow*). Produksi sitokin tersebut akan menyebabkan terganggunya fungsi *hematopoietic stem cell* (HSCs) sebagai induk dari pembentuk sel darah. Terjadinya inflamasi seringkali mengganggu keseimbangan proses hematopoiesis, hal ini dikarenakan pada kondisi tersebut HSCs cenderung untuk menuju garis pembentukan myeloid seperti makrofag dan sel darah putih sebagai respon terjadinya inflamasi. Hal inilah yang menyebabkan proses hematopoiesis terganggu (Mirantes dkk., 2014). Produksi sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 β , TNF- α juga berpengaruh dalam pembentukan eritrosit. Produksi sitokin akan menyebabkan terjadinya supresi eritropoiesis pada sumsum tulang (Pierce & Larson, 2005).

Tapak liman (*Elephantopus scaber*) merupakan tanaman obat yang sering digunakan untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti hepatitis, scabes, neoplasma, demam dan lain-lain (Dalimartha, 2007). Menurut Wang dkk. (2014) *E. scaber* mengandung senyawa deoxyelephantopin dan isoscarbortopin yang berpotensi sebagai anti-inflamasi. Selain tapak liman, tanaman katuk (*Sauropus androgynus*) merupakan salah satu tanaman yang herbal yang juga sering digunakan dalam bidang medis seperti obat untuk meringankan batuk, menurunkan demam, serta meningkatkan laktasi pada ibu yang sedang menyusui. *S. androgynus* juga bersifat sebagai antioksidan dan antibakteri (Wei dkk., 2011). Tanaman ini dikenal pula dengan sebutan *multivitamingreen* dikarenakan banyak mengandung vitamin seperti vitamin A, vitamin B1, B2, B3, C, dan E. Selain vitamin tanaman ini juga mengandung mineral yang mampu meningkatkan proses eritropoiesis (Petrus, 2013).

Penelitian sebelumnya menunjukkan kombinasi ekstrak daun *E. scaber* dan *S. androgynus* mampu meningkatkan level eritrosit pada mencit bunting yang diinfeksi dengan *Salmonella thyphi* (Djati dkk., 2017). Penelitian mengenai pengaruh kombinasi kedua ekstrak tersebut terhadap infeksi *E. coli* belum banyak dilakukan. Berdasarkan hal tersebut penelitian ini penting dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh kombinasi dari ekstrak daun *E. scaber* serta *S. andryognyus* pada sel hematopoietik mencit bunting yang terinfeksi *E. coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dari penelitian adalah:

1. Bagaimana pengaruh kombinasi ekstrak daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) dan katuk (*Sauropus androgynus*) terhadap progenitor hematopoietik Ter119⁺CD34⁺, Ter119⁺VLA-4⁺, Gr-1⁺ pada mencit bunting BALB/c setelah infeksi *E. coli*?
2. Bagaimana pengaruh kombinasi ekstrak daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) dan katuk (*Sauropus androgynus*) perkembangan sel B limfosit B220⁺SDF-1⁺ pada mencit bunting BALB/c setelah infeksi *E. coli*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini diantaranya adalah:

1. Menganalisis pengaruh kombinasi ekstrak daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) dan katuk (*Sauropus androgynus*) terhadap progenitor hematopoietik Ter119⁺CD34⁺, Ter119⁺VLA-4⁺, Gr-1⁺ pada mencit bunting BALB/c setelah infeksi *E. coli*.
2. Menganalisis pengaruh kombinasi ekstrak daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) dan ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*) perkembangan sel B limfosit B220⁺SDF-1⁺ pada mencit bunting BALB/c setelah infeksi *E. coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini memiliki manfaat bagi masyarakat untuk memanfaatkan tanaman herbal sebagai obat anemia. Tanaman obat ini bisa dijadikan sebagai alternatif pengganti obat-obatan sintetik yang memiliki efek samping untuk kondisi tertentu. Penelitian ini juga bisa dimanfaatkan sebagai acuan untuk penelitian lanjutan yang akan dilakukan selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

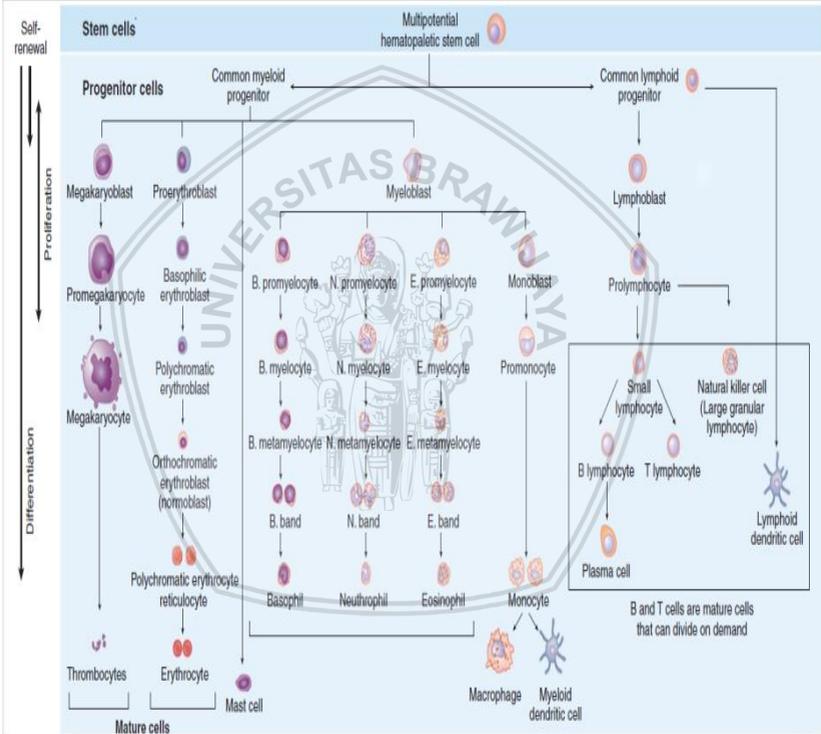
2.1 Hematopoiesis

Hematopoiesis merupakan suatu proses hirarkis (Gambar 1) yang terjadi dalam sumsum tulang (*bone marrow*) untuk menghasilkan berbagai jenis sel darah (Mirantes dkk., 2014). Sel-sel darah matang pada manusia terdiri dari lebih 10 jenis sel darah yang berbeda, contohnya ialah sel darah merah (eritrosit), megakariosit / platelet, sel mieloid (monosit/makrofag dan granulosit), *mast cells*, limfosit B, limfosit T, serta sel *natural killer* (NK) (Seita & Weissman, 2010). Berbagai jenis sel darah tersebut berasal dari satu jenis sel spesifik yang sama yaitu sel induk *hematopoietic stem cells* (HSCs) (Mirantes dkk., 2014).

Hematopoietic stem cells (HSCs) merupakan sel yang bersifat multipotensi serta memiliki kemampuan *self-renewal*. HSCs dengan sifat multipotensinya mampu berdiferensiasi membentuk berbagai jenis sel yang fungsional, sedangkan *self-renewal* merupakan kemampuan sel HSCs untuk membentuk kembali HSCs (Seita & Weissman, 2010). HSCs akan membentuk dua jenis garis keturunan sel dalam dua jenis progenitor yang berbeda, yaitu *common lymphoid progenitors* (CLPs) serta *comon myeloid progenitors* (CMPs). CLPs akan menghasilkan semua garis keturunan sel limfoid yaitu Sel B, Sel T, dan sel *natural killer* (NK), sedangkan CMPs akan menghasilkan semua garis keturan sel myeloid seperti megakariosit dan eritrosit (MegE), granulosit dan makrofag (GM). Tipe sel lain yaitu dendritik sel bisa berasal dari CLPs ataupun CMPs (Kondo, 2010).

Ekspresi HSCs manusia dan mencit memiliki persamaan. Beberapa *marker* permukaan pada sel hematopoietik diantaranya ialah sel B (CD19, B220), sel limfoid T (CD4, CD8, CD3), makrofag (CD15, Mac-1) dan granulosit (Gr-1) (Hoffbrand dkk., 2016). *Marker* yang penting lainnya yaitu Ter119. Ter119 merupakan *marker* yang terekspresikan pada sel eritoid yang spesifik (Zhang, 2011). *Marker* permukaan sel yang hanya ditemukan pada HSC yang belum matang dan progenitor sel ialah CD34. CD34 merupakan fosfolipoprotein transmembran yang memiliki berat molekul sekitar 115 kDa (Sidney dkk., 2014). *Granulocyte receptor-1* (GR-1) merupakan salah satu *marker* yang terekspresikan pada populasi

myeloid. Gr-1 dihubungkan dengan proses diferensiasi granulosit dan maturasi (Gabrilovich, 2013). GR-1 diyakini sebagai *marker* yang terekspresi pada granulosit yang telah mengalami kematangan. GR-1 merupakan *marker* yang spesifik untuk neutrofil, akan tetapi beberapa jenis sel lain juga mengekspresikan *marker* tersebut seperti monosit/makrofag, dendritik sel (DC), serta sebagian limfosit (Daley dkk., 2008)



(Bunn & Aster, 2011)

Gambar 1. Proses hierarkis hematopoiesis

Proses perkembangan sel-sel hematopoietik dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya ialah adanya suatu senyawa kemokin.

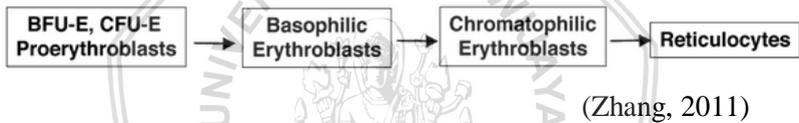
Salah satu kemokin yang mampu mempengaruhi proses hematopoiesis contohnya ialah *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1). SDF-1 dikenal pula dengan nama PBSF (*Pre-B cell growth-stimulating factor*). Kemokin ini merupakan jenis kemokin C-X-C yaitu CXCL12 (Phillai, 2000). SDF-1 merupakan *growth factor* yang mempengaruhi sel prekursor limfosit (Marone dkk., 2000). SDF sangat berperan penting dalam tahap awal perkembangan sel B (Rajendram dkk., 2013). Kemokin yang disekresikan oleh *bone marrow* serta sel stroma ini memiliki potensi sebagai stimulator proliferasi dari pro-sel B. Kemokin ini selain berperan dalam perkembangan sel B ternyata juga berperan dalam proses *homming* sel T naive dan sel B naive ke *lymph node* (Phillai, 2000)

Perkembangan sel eritrosit juga dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satu protein yang berperan dalam perkembangan sel eritrosit ialah anggota *very-late activation antigen* (VLA). VLA merupakan protein yang tergolong dalam superfamili integrin. Sel prekursor eritroblastik mampu berikatan dengan protein fibronektin. Proses ini dikenal dengan proses adhesi. Proses adhesi berperan penting dalam mengatur differensiasi sel (Roseblatt dkk., 1991). VLA-4 dan VLA-5 merupakan reseptor fibronektin yang diekspresikan oleh prekursor eritroblast yang belum matang. Reseptor fibronektin ini akan diekspresikan oleh eritroblas hingga memasuki tahapan retikulosit saat proses eritropoiesis. Fibronektin merupakan suatu protein matriks ekstraselluler yang disintesis oleh sel stroma (Keating dkk., 2005)

2.2 Eritropoiesis

Eritropoiesis merupakan salah proses pada hematopoiesis. Eritropoiesis terjadi secara hirarkis dalam pembentukan sel darah merah (Zhang, 2011). Proses ini berasal dari HSCs yang mengalami proliferasi di medula sumsum tulang (*bone marrow*). HSCs merupakan sel yang memiliki kemampuan memperbaharui diri (*self renewal*) yang sangat tinggi. HSCs akan mengalami diferensiasi menjadi dua jenis sel progenitor yaitu myeloid dan limfoid progenitor. Sel darah merah berasal dari sel progenitor myeloid. Sel progenitor tersebut bersifat multipoten dan mampu berdiferensiasi membentuk dua garis keturunan yaitu eritoid/megakariosit dan granulosit/makrofag (Singh dkk., 2016).

Secara garis besar proses eritropoiesis dibagi menjadi tiga tahapan. Tahapan pertama yaitu perkembangan HSCs membentuk garis keturunan eritropoietik menghasilkan *erythroid-committed blast cells*. Tahapan kedua ialah pembelahan dan diferensiasi progenitor eritoid dan tahapan terakhir ialah pematangan sel (Singh dkk., 2016). Progenitor eritoid paling awal ialah *burst unit erythroid cell* (BFU-E), lalu BFU-E akan berkembang menjadi *colony forming unit cell* (CFU-E). Progenitor eritroid tersebut akan tumbuh dan berdiferensiasi menjadi proeritroblas, basofilik, polikromik serta ortokromik eritroblas (Gambar 2). Sel eritroblast tersebut kemudian dihilangkan inti selnya sehingga membentuk retikulosit. Tahapan terakhir dari proses ini ialah pematangan retikulosit menjadi eritrosit (Zhang, 2011).



Gambar 2. Proses eritropoiesis

Sel eritrosit memiliki protein *marker* yang spesifik, yaitu Ter 119. Marker Ter119 merupakan protein yang terekspresikan pada permukaan sel eritoid spesifik. Ekspresi Ter119 akan meningkat pada tahap eritroblas basofilik (Zhang, 2011). Ter119 akan terekspresikan pada sel-sel eritroblas hingga mengalami pematangan, akan tetapi. Ter119 tidak terekspresikan pada *burst unit erythroid cell* (BFU-E) dan *colony forming unit cell* CFU-E (Hawley & Hawley, 2004).

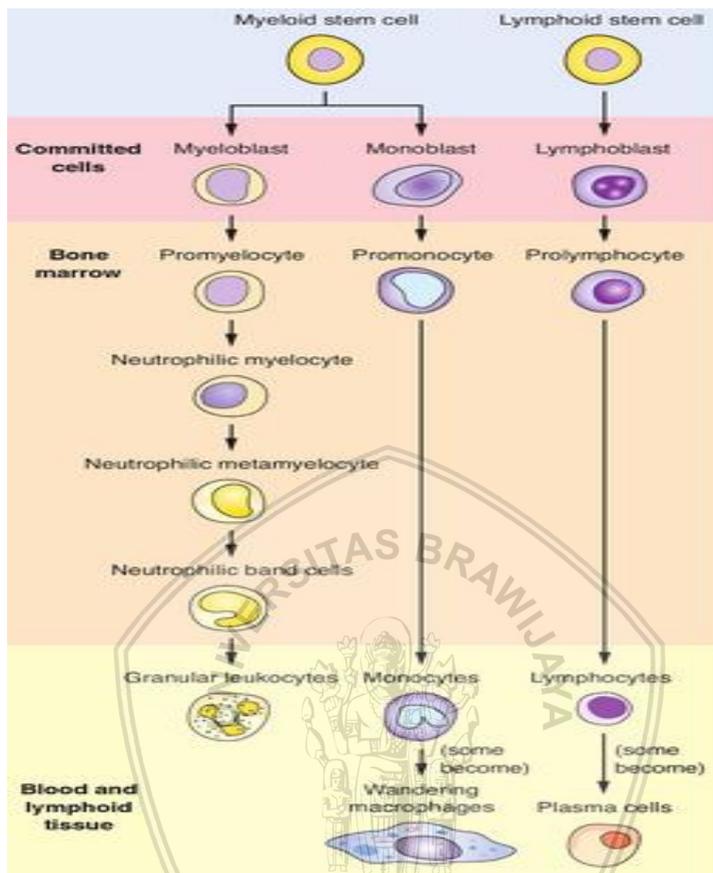
2.3 Leukopoiesis

Leukopoiesis merupakan tahap perkembangan dari sel-sel darah putih (leukosit). Sel-sel darah putih berasal dari *stem cell* yang bersifat multipoten yang ada pada *bone marrow* (Aghababian, 2011). Leukosit terdiri dari beberapa jenis diantaranya ialah neutrofil,

eosinofil, basofil, monosit/makrofag, dan limfosit. Neutrofil, eosinofil dan basofil dikenal sebagai sebagai sel darah putih granulosit. Granulosit ialah kelompok leukosit yang memiliki ciri khusus. Granulosit merupakan kelompok leukosit yang memiliki granula pada bagian sitoplasmanya serta nukleusnya tersegmentasi membentuk beberapa lobus (Keohane dkk., 2016).

Leukosit berkembang dari dua jenis stem sel yang berbeda. Granulosit dan agranulosit monosit/makrofag berasal dari myeloid *stem cell*, sedangkan limfosit bersal dari limfoid *stem cell* (Gambar 3). Prekursor sel yang belum matang (*immature*) dari setiap sel leukosit disebut dengan *blast cell*. *Blast cell* dari leukosit ada tiga jenis yaitu myeoblas, monoblas, dan limfoblas. Myeoblas merupakan sel prekursor granulosit yang memiliki nukleus berbetuk bulat hingga oval (Hannon dkk., 2009). Myeoblas pada tahapan selanjutnya akan berkembang akan berkembang dalam beberapa tahapan yaitu promyelosit, myelocytes, metamyelosit. Metamyelosit akan mengalami diferensiasi membentuk neutrofil, basofil, dan eosinofil (Aghababian, 2011).

Blast cell yang lainnya yaitu monoblas akan berkembang menjadi promonosit. Promonosit kemudian akan berkembang menjadi monosit. Jenis sel darah yang terakhir ialah limfosit. Limfosit berkembang dari limfoblas. Limfoblas akan mengalami perkembangan membentuk prolimfosit yang selanjutnya berdiferensiasi membentuk sel B dan sel T (Hannon dkk., 2009).



(Hannon dkk., 2009)

Gambar 3. Tahap perkembangan sel leukosit

2.4 Hubungan Inflamasi oleh *E. coli* dengan Sistem Hematopoietik

Inflamasi merupakan suatu bentuk respon protektif dari sistem imun yang diinduksi oleh adanya berbagai proses patofisiologis. Proses patofisiologis tersebut bisa disebabkan karena adanya infeksi ataupun cedera/kerusakan jaringan (Kovtonyuk dkk., 2016). Terjadinya inflamasi bisa diakibatkan oleh adanya infeksi mikroba. Salah satu mikroba yang sering dijumpai dan berperan sebagai agen

penginfeksi ialah bakteri (Medzhitov, 2008). *E. coli* ialah salah satu bakteri yang bisa menyebabkan terjadinya infeksi sistemik. *E. coli* merupakan bakteri yang sering dikaitkan dengan suatu kondisi bakteremia pada manusia (Burberry dkk., 2014).

E. coli merupakan bakteri gram negatif yang memiliki struktur berupa lipopolisakrida (LPS) pada bagian dinding selnya. LPS merupakan komponen yang sangat penting yang menentukan sifat virulensi dari bakteri tersebut. LPS akan dikenali oleh *toll-like receptor 4* (TLR4) yang terekspresikan pada permukaan sel imun efektor (Burberry dkk., 2014). Pengenalan LPS oleh TLR4 akan mengaktifasi NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*) kompleks transkripsi dan menginduksi terbentuknya sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF- α , IL-1 β , dan IFN tipe 1 (Greenhill dkk., 2011). Sitokin proinflamasi merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi proses hematopoiesis. Terbentuknya sitokin tersebut menginduksi *uncommitted progenitor* lebih berkembang membentuk garis keturunan sel progenitor myeloid dibandingkan progenitor limfoid progenitor. Hal ini tentunya mengakibatkan proses limfopoiesis menjadi terhambat (Mirantes dkk., 2014).

Kondisi inflamasi juga sangat mempengaruhi proses pembentukan sel darah merah (eritropoiesis). Kondisi inflamasi bisa menyebabkan terjadinya kondisi hipoferremia dan anemia (Weiss & Goodnough, 2005). Terjadinya inflamasi akan mempengaruhi tiga tahapan penting di dalam proses eritropoiesis. Pertama kondisi inflamasi akan mengakibatkan terganggunya mekanisme transportasi besi, serta menyebabkan kondisi retensi besi di dalam sel makrofag. Kondisi ini akan mengakibatkan terjadinya defisiensi besi pada proses eritropoiesis. Pengaruh kedua ialah terjadinya proses *blunting response* dari hormon eritropoietin, yaitu hormon utama yang diperlukan dalam eritropoiesis. Pengaruh ketiga dari inflamasi ialah menyebabkan terhambatnya diferensiasi dan proliferasi sel progenitor eritoid (Weiss & Gasche, 2010).

2.5 Tapak Liman (*Elephantopus scaber*, Linn)

2.5.1 Deskripsi umum dan klasifikasi

Elephantopus scaber merupakan salah satu jenis tanaman yang tumbuh secara luas di daerah negara Asia. Tanaman ini telah sering

digunakan sebagai obat di banyak daerah seperti Asia Tenggara, Amerika Latin dan Afrika sejak waktu yang lama (Subramoniam, 2016). Tanaman dengan nama lokal tapak liman ini dapat tumbuh di daerah dengan ketinggian 1.200 m dpl. Tapak liman termasuk tanaman yang sangat mudah dijumpai. Tapak liman dapat tumbuh liar di tepi jalan, lapangan, ataupun pematang (Dalimartha, 2007).

Tapak liman merupakan tanaman tegak jenis herba. Tanaman ini biasanya memiliki ketinggian 30-60 cm. Daunnya tumbuh di bagian bawah batang (basal) membentuk struktur *rossete* dengan panjang 10-25 cm (Kabeer & Prathapan, 2014). Daunnya memiliki warna hijau tua. Daun tersebut berbentuk jorong, tepi melekok dan bergerigi tumpul (Gambar 4). Ujung daun berbentuk tumpul. Daun tapak liman memiliki permukaan kasar yang berambut, serta memiliki tipe pertulangan daun menyirip (Dalimartha, 2007). Tumbuhan ini memiliki batang yang bercabang serta kaku. Bunganya berwarna ungu dengan panjang 8-10 mm. Bunga tapak liman biasanya tumbuh di bagian ujung dari percabangan batang (Hiradeve & Rangari, 2014)

Elephantopus scaber termasuk tumbuhan yang tergolong dalam genus *Elephantopus*. Genus ini terdiri dari sekitar 32 spesies yang berbeda. *E. scaber* diketahui pula tergolong ke dalam famili *asteraceae* (Hiradeve & Rangari, 2014). Menurut *database United States Departement / USDA* (2017) klasifikasi dari *E.scaber* ialah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Asteridae

Ordo : Asterales

Famili : Asteraceae

Genus : *Elephantopus*

Spesies : *Elephantopus scaber* L.



(Dalimartha, 2007)

Gambar 4. Bentuk daun tapak liman (*E. scaber*)

2.5.2 Kandungan Senyawa Kimia

Tapak liman telah lama digunakan untuk mengobati beberapa penyakit. Tumbuhan ini digunakan sebagai antibakteri, antiinflamasi, antipiretik, diuretik, batuk, antibiotik, penyembuh luka dan lain-lain (Aslam dkk., 2015). Analisis fitokimia dari ekstrak etanol tumbuhan menunjukkan bahwa tapak liman memiliki beberapa senyawa metabolit sekunder. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya ialah triterpenoid seperti lupeol, sesquiterpene lactone,

deoxyelephantopin, isodeoxyelephantopin, scabertopin, elescaberin, isoscabertopin, dan 7,19-dihydrodeoxyelephantopin.), asam lemak eter (ethyl hexadecanoate, ethyl-9,12-octadecadienoate, ethyl-(Z)-9-octadecenoate, and ethyl octadecanoate), stigmasterol glucoside, alkaloids aurones, chalcones dan fenol. Ekstrak etanol tersebut memiliki potensi sebagai antibakteri untuk melawan *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Ho dkk., 2009).

Isodeoxyelephantopin merupakan salah satu jenis dari senyawa sesquiterpene yang berpotensi sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat aktivasi NFkB. Senyawa ini juga mampu berperan dalam proses stimulasi dan proliferasi sel limfosit. Tapak liman juga memiliki kandungan flavonoid berupa trisin dan luteolin (Hiradeve & Rangari, 2013). Senyawa flavonoid tersebut merupakan senyawa yang bersifat sebagai antiinflamasi (Shalini dkk., 2012).

2.6 Katuk (*Sauropus androgynus*, L.Merr)

2.6.1 Deskripsi umum dan klasifikasi

Katuk (*Sauropus androgynus*) merupakan tanaman yang banyak ditemukan di daerah Asia Tenggara. Katuk biasanya tumbuh dengan cepat di tempat yang lembap, akan tetapi tumbuhan ini bisa mengalami dormansi di lingkungan yang lebih dingin. Tumbuhan ini merupakan salah satu spesies asli Indonesia yang berasal dari daerah Kalimantan. Katuk bisa tumbuh di daerah dataran rendah namun tumbuhan ini juga bisa tumbuh di daerah dengan ketinggian hingga 1300 m (Petrus, 2013). Katuk memiliki beberapa ciri umum yang mudah diamati. Katuk merupakan tanaman herba yang berbatang tegak (Gambar 5). Batangnya umumnya berbentuk bulat serta bisa tumbuh hingga mencapai ketinggian 500 cm (Bunawan dkk., 2015). Daun katuk berwarna hijau dan berupa daun majemuk. Bentuk daunnya bulat telur dengan tepi daun rata, ujungnya runcing, dan pangkalnya tumpul. Daun katuk berukuran kecil dengan panjang 1-6 cm, lebar 1-4 cm. Tumbuhan ini memiliki jenis pertulangan daun menyirip (Redaksi Agromedia, 2008).



(Bunawan dkk., 2015)

Gambar 5. Bentuk daun katuk (*S. androgynus*)

Selain memiliki daun majemuk, katuk juga memiliki bunga bertipe majemuk. Bunga ini tumbuh secara perenial. Mahkota bunga berwarna ungu dengan bentuk bulat telur. Buahnya berupa buah buni. Bentuk buah bulat dan berwarna hijau keputih-putihan (Redaksi Agromedia, 2008). Katuk disebut juga sebagai daun manis. Menurut *database United States Departement / USDA* (2017) klasifikasi dari *S. androgynus* ialah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Rosidae

Ordo : Euphorbiales

Famili : Euphorbiaceae

Genus : *Sauropus*

Species : *Sauropus androgynus* (L.) Merr.

2.6.2 Kandungan senyawa kimia

Katuk (*S. androgynus*) ialah tumbuhan dari famili Euphorbiaceae yang dikenal sebagai tumbuhan yang kaya akan vitamin (*Multivitamin plant*) (Bunawan dkk., 2015). *S. androgynus* memiliki kandungan vitamin A (karotenoid), vitamin B, serta vitamin C (asam askorbat) yang tinggi. Tumbuhan ini juga megandung protein serta mineral yang tinggi (Gayathramma dkk., 2012).

Daun katuk memiliki komponen kimia yang bervariasi. Beberapa komponen fitokimia pada daun katuk diantaranya ialah sterol, resin, tanin, saponin, alkaloid, flavonoid, terpenoid, glikosida, fenol, katekol dan lain-lain. Komponen fitokimia pada tumbuhan ini memiliki potensi sebagai antioksidan yang baik (Bunawan dkk., 2015). Salah satu kandungan fitokimia yang berperan sebagai antioksidan pada tumbuhan ini ialah flavonoid. *S. androgynus* memiliki kandungan flavonoid yang sangat tinggi. Apigenin and luteolin merupakan salah satu flavonoid yang bisa ditemukan pada *S. androgynus*, kedua komponen fitokima tersebut memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi. *S. androgynus* diketahui pula memiliki kandungan fitokimia yang lain seperti karoten, stigmasterol, serta alkaloid berupa papaverin (Djati, 2017).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi, Struktur dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dimulai pada bulan Januari 2018 – Mei 2018.

3.2 Kerangka Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap. Peneliti memberikan perlakuan pada hewan coba serta menganalisis efek terhadap variabel yang diamatinya. Penelitian ini terdiri dari 8 perlakuan sebagai berikut:

- K1 : Kelompok mencit bunting tanpa infeksi *E. coli* dan tidak diberi perlakuan kombinasi ekstrak.
- K2 : Kelompok Mencit bunting yang diinfeksi *E. coli* dan tidak diberi kombinasi ekstrak.
- P1 : Kelompok mencit bunting diberikan infeksi *E. coli* dengan pemberian ekstrak *E. scaber* 100%.
- P2 : Kelompok mencit bunting diberikan infeksi *E. coli* dengan pemberian ekstrak *E. scaber* 75% dan *S. androgynus* 25%
- P3 : Kelompok mencit bunting diberikan infeksi *E. coli* dengan pemberian ekstrak *E. scaber* 50% dan *S. androgynus* 50%.
- P4 : Kelompok mencit bunting diberikan infeksi *E. coli* dengan pemberian ekstrak *E. scaber* 25% dan *S. androgynus* 75%.
- P5 : Kelompok mencit bunting diberikan infeksi *E. coli* dengan pemberian ekstrak *S. androgynus* 100%.
- P6 : Kelompok mencit bunting tanpa infeksi *E. coli* dan diberi perlakuan kombinasi ekstrak *E. scaber* 50% dan *S. androgynus* 50% (Djati dkk., 2013).

3.3 Deskripsi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan untuk penelitian ini ialah mencit (*Mus musculus*) bunting strain BALB/c yang berumur 4-5 minggu yang diperoleh dari LPPT Universitas Gajahmada, Yogyakarta.

Penelitian ini terdiri dari 8 perlakuan dan 3 ulangan. Mencit yang digunakan sebanyak 48 ekor. Mencit yang digunakan ialah mencit yang berada dalam kondisi sehat dengan ciri-ciri bergerak aktif, rambut halus, mengkilap dan tidak rontok, mata merah, serta tidak ada cacat fisik. Mencit kemudian diaklimasi selama 7 hari. Mencit diberi makanan dan minuman yang cukup. Sekam pada kandang mencit diganti 2 hari sekali sedangkan berat badan mencit ditimbang setiap hari.

3.4 Pembuntingan Hewan Coba

Mencit dikawinkan setelah 7 hari aklimatisasi. Sebanyak tiga mencit betina diletakkan dalam satu kandang dengan satu mencit jantan. Perkawinan ini dilakukan ketika mencit betina berada dalam kondisi estrus, kondisi tersebut bisa diketahui dari pembuatan apus vagina. Setiap tiga hari sekali mencit jantan diganti dari kandang satu ke kandang lainnya. Setiap pagi dilakukan pengamatan *vagina plug* pada mencit betina untuk mengetahui terjadinya perkawinan.

3.5 Ekstraksi Daun Tapak Liman (*E. scaber*) dan Daun Katuk (*S. androgynus*)

Serbuk daun *E. scaber* dan *S. androgynus* didapatkan dari Material Medica Batu, Malang. Masing-masing serbuk daun dimasukkan ke dalam botol yang berbeda, kemudian masing-masing serbuk dimaserasi dengan etanol 70% lalu botol ditutup rapat. Botol kemudian disimpan pada tempat gelap selama 24 jam. Masing-masing larutan disaring dan ditambahkan etanol 70% baru. Selanjutnya diinkubasi kembali hingga terlihat warna asli etanol, hal ini menandakan bahwa senyawa pada masing-masing tanaman telah terekstrak seluruhnya. Hasil ekstraksi lalu diuapkan dengan cara diletakkan dalam *water bath* pada suhu 50°C dengan menggunakan *vacuum pump evaporator*, hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa larutan etanol. Selanjutnya akan diperoleh ekstrak yang berbentuk kental (pasta).

Selanjutnya dibuat larutan stok menggunakan ekstrak dari daun tapak liman (*E. scaber*) dan katuk (*S. androgynus*). Ekstrak dari masing-masing tanaman ditimbang menggunakan neraca elektrik. Masing-masing ekstrak yang telah ditimbang sesuai dosis yang

dibutuhkan. Tahapan selanjutnya dilarutkan kedalam 10 mL akuades (untuk stok 7 hari) dan di campur menggunakan *stirrer* hingga terlarut sempurna.

3.6 Preparasi (*Escherichia coli*)

Isolat bakteri *E. coli* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Preparasi *E.coli* dilakukan dengan membuat media padat dan media cair. Komposisi media padat yang digunakan ialah dengan menggunakan 0,96 g *Nutrient Broth* (NB) dan 1,8 g *bacterial agar*. Kedua bahan dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades 120 mL lalu dipanaskan hingga mendidih. Media cair yang digunakan ialah NB sebanyak 0,4 gram lalu ditambahkan dengan akuades sebanyak 50 mL dan dipanaskan hingga mendidih. Media padat dan media cair kemudian disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121° C selama 15 menit.

Tahapan selanjutnya ialah peremajaan *E. coli*. Tahapan ini dilakukan di *laminar air flow* (LAF) untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Media padat steril yang telah dipanaskan ditunggu hingga suhu media menjadi hangat. Media lalu dituangkan pada cawan petri dan ditunggu hingga media memadat. *E. coli* lalu diambil dari stok menggunakan ose dan *distreak* pada media tersebut. Media yang telah berisi inokulasi bakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

E. coli yang telah diremajakan kemudian diambil menggunakan ose dan diinokulasikan pada media NB sebanyak 50 mL. Hasil inokulasi tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Bakteri yang telah diinkubasi kemudian dihitung dengan hemositometer hingga jumlah bakteri mencapai 1×10^7 CFU/mL. Sebanyak 1.000 µl biakan bakteri diambil dan dipindahkan ke *microtube*. Biakan lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, 4°C, 5 menit. Supernatan lalu dibuang, sedangkan pelet ditambahkan pbs sebanyak 1.000 µl dan dipipetting.

3.7 Pemberian Perlakuan

Kombinasi ekstrak *E. scaber* dan *S. androgynus* diberikan pada mencit *oral gavage* pada hari ke-1 hingga ke-4 kebuntingan. Mencit

kemudian diinfeksi dengan *E. coli* pada hari ke-5 kebuntingan secara intraperitoneal. Setelah itu dilakukan uji konfirmasi *E. coli* untuk mengetahui keberhasilan injeksi. Kombinasi ekstrak lalu diberikan kembali pada hari ke-6 hingga pembedahan. Pembedahan dilakukan sebanyak 2 kali yaitu hari ke-8 kebuntingan dan hari ke-16 kebuntingan.

Penelitian ini menggunakan 8 perlakuan kelompok mencit dengan 3 ulangan. Jumlah *E. coli* yang diinfeksi ialah 10^7 CFU/mL dalam 0,1 ml. Setiap perlakuan memiliki perbandingan dosis kombinasi ekstrak yang berbeda. Dosis pada masing-masing ekstrak pada setiap perlakuan disajikan pada (Tabel 1).

Tabel 1. Kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	Infeksi 10^7	Serbuk	Serbuk
	CFU/ml <i>E. coli</i>	<i>E. scaber</i> mg/kg BB	<i>S. androgynus</i> mg/kg BB
K1 (-)	-	-	-
K2 (+)	+	-	-
P1	+	200	-
P2	+	150	37,5
P3	+	100	75
P4	+	50	112,5
P5	+	-	150
P6	-	100	75

(Djati dkk., 2017)

Keterangan:

(-) = tidak diberi perlakuan

(+) = diberi perlakuan

3.8 Uji Konfirmasi *E. coli*

Mencit diinfeksi *E. coli* selama 24 jam, berikutnya dilakukan uji konfirmasi yang bertujuan untuk mengetahui keberhasilan infeksi *E. coli* pada mencit. Uji konfirmasi dilakukan dengan menggunakan darah mencit melalui pembuluh *vena caudalis* (ekor). Ekor mencit

yang telah diberi alkohol 70% lalu dipotong ± 2 mm pada bagian ujungnya. Tetesan darah pertama dibuang, ekor mencit kemudian diurut dari pangkal menuju ujung ekor. Tetesan darah ditampung dalam tabung antikoagulan. Sebanyak 450 μ l larutan NaCl fisiologis steril lalu ditambahkan pada darah tersebut. Darah kemudian diinokulasikan pada media NB dan diinkubasi dengan *shaker* pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Isolat setelah itu diinokulasikan pada media padat.

Proses berikutnya dilakukan uji konfirmasi berupa uji katalase dan pewarnaan gram. Uji katalase dilakukan dengan cara berikut. Pertama biakan bakteri diambil dengan ose lalu diletakan pada gelas objek yang telah ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung berupa oksigen (O_2) dari perombakan H_2O_2 , sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gelembung (Cornelissen dkk., 2013).

Uji konfirmasi kedua ialah pewarnaan gram. Uji ini digunakan untuk membedakan antara bakteri gram positif dan gram negatif. Pertama bakteri difiksasi dengan 95% metanol selama 2 menit. Tahapan berikutnya ditambahkan pewarna primer (kristal violet) selama 1 menit, preparat lalu dicuci dengan air mengalir. Tahapan berikutnya ditambahkan mordan selama 1 menit, preparat lalu dicuci dengan air mengalir. Larutan ketiga yang ditambahkan ialah *decolorize*, rendam larutan selama 5-15 detik lalu dicuci dengan air mengalir. Terakhir counterstrain dengan safranin selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir (Goldman & Green, 2015). Preparat kemudian diamati dengan mikroskop.

3.9 Isolasi Sel-sel *Bone Marrow*

Pertama-tama dilakukan proses dislokasi pada mencit di bagian leher. Tulang femur dan tibia lalu diisolasi dan dibersihkan dari sisa jaringan otot yang menempel pada kedua tulang tersebut. Kedua tulang yang telah bersih dari jaringan otot lalu dibersihkan sebanyak dua kali dengan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS). Kedua ujung tulang femur dan tibia selanjutnya dipotong. Sel pada *bone marrow* diisolasi dengan cara *flushing out* menggunakan *syringe* yang telah berisi 1 ml PBS. Hasil isolasi selanjutnya dimohogenkan dengan cara *pipeting*. Homogenat lalu dipindahkan ke tabung *centrifuge* dan ditambahkan PBS hingga mencapai volume 10 mL.

Sampel lalu disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm pada suhu 10° C selama 15 menit. Supernatan yang didapatkan dibuang lalu pelet diresuspendi dengan PBS sebanyak 1 mL.

3.10 Pewarnaan Antibodi

Sebanyak 3 *tube* disiapkan dan diisi dengan PBS sebanyak 350 µl. Masing-masing *tube* ditambahkan dengan hasil resuspensi sel sebanyak 250 µl. Sampel selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, suhu 10° C, selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet diwarnai dengan antibodi spesifik. Kombinasi pewarnaan tersebut ialah sebagai berikut.

1. FITC-*conjugated rat anti mouse* GR-1, PE-*conjugated rat anti mouse* VLA-4, PE/CY5- *conjugated rat anti mouse* TER199.
2. FITC-*conjugated rat anti mouse* CD34, PE-*conjugated rat anti mouse* CD55, PE/CY5- *conjugated rat anti mouse* TER199
3. FITC-*conjugated rat anti mouse* GR-1, PE-*conjugated rat anti mouse* B220, PE/CY5- *conjugated rat anti mouse* SDF

Kelompok kombinasi pewarnaan 1 dan 2 merupakan pewarnaan ekstraseluler, sedangkan kelompok kombinasi pewarnaan 3 merupakan pewarnaan intraseluler. Pewarnaan ekstraseluler dilakukan dengan cara pelet ditambahkan 50 µl antibodi dan diinkubasi selama 20-30 menit dalam *ice box*. Pewarnaan antibodi pada kelompok kombinasi pewarnaan 3 dilakukan dengan cara diberi pewarnaan antibodi ekstraseluler terlebih dahulu, kemudian ditambahkan sebanyak 50 µl larutan fiksatif yaitu *cytofix/cytoperm*. Tahapan selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 10° C. Residu dari larutan fiksatif lalu dihilangkan dengan cara menambahkan larutan *washing* yaitu *washperm* sebanyak 500 µl, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm at 10°C selama 5 menit. Supernatan dibuang sedangkan pelet diwarnai dengan antibodi intraseluler spesifik lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu 10°C.

3.11 Analisis *Flow cytometry*

Sebanyak 500 µl PBS ditambahkan pada sampel yang telah diberi pewarna. Sampel lalu dipindahkan ke *cuvet flow cytometry* kemudian dihomogenkan dengan pipet. Analisis *flow cytometry* dilakukan

dengan menggunakan alat *flow cytometry* dan komputer yang telah terinstal dengan *software* BD Quest ProTM. Alat tersebut lalu dihidupkan, kemudian dilakukan *plot setting* pada *acquiring mode*. *Flow cytometry* diatur dalam keadaan *Low-Run*, setelah itu kuvet dipasang pada nozzle BD Biosciences FACS CaliburTM *flow cytometry*.

3.12 Analisis Data

Data hasil analisa dengan menggunakan *softwer* BD *cellquest* ProTM selanjutnya dianalisis statistik menggunakan program SPSS 1.6. Data yang digunakan merupakan jumlah relatif sel TER119⁺CD34⁺, TER119⁺VLA-4⁺, Gr-1⁺ dan B220⁺SDF-1⁺. Data dianalisis dengan *two-way* ANOVA dengan selang kepercayaan 95% maka dilakukan uji lanjut berupa uji *Tukey test*.

3.13. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial yang terdiri dari dua faktor. Faktor pertama pada penelitian ini adalah hari pembedahan. Hari pembedahan dilakukan sebanyak dua kali yaitu pada hari ke-8 kebuntingan, dan hari ke-16 kebuntingan. Faktor kedua ialah dosis dari kombinasi ekstrak *E. scaber* dan *S. androgynus*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

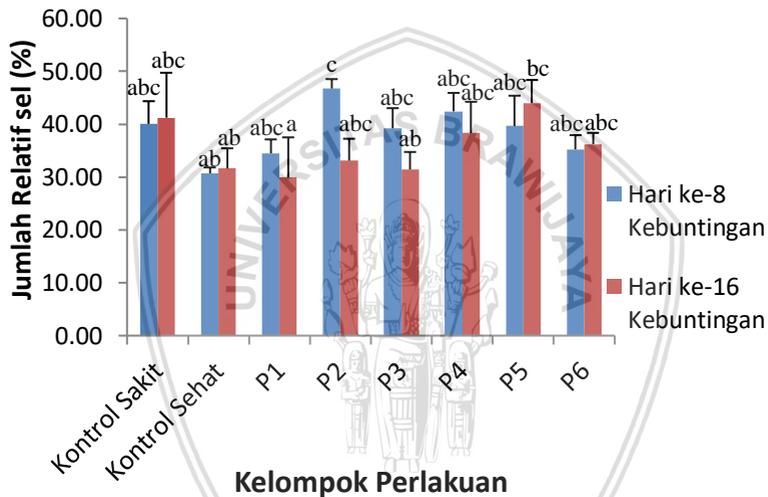
4.1 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi Sel GR1⁺

Hasil penelitian ini menunjukkan ekspresi sel hematopoietik pada beberapa perlakuan. Hasil tersebut salah satunya menunjukkan ekspresi dari sel GR1⁺ yaitu *marker* dari sel granulosit. Berdasarkan (Gambar 6) diketahui bahwa terjadi peningkatan jumlah relatif sel GR1⁺ pada kelompok kontrol sakit dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat. Peningkatan jumlah relatif sel ini terjadi pada hari ke-8 kebuntingan maupun hari ke-16 kebuntingan. Jumlah relatif sel GR1⁺ kelompok kontrol sehat pada hari ke-8 kebuntingan sebesar 30,71% kemudian terjadi kenaikan jumlah sel relatif pada kelompok kontrol sakit dengan nilai 40,06%. Pada hari ke 16 kebuntingan jumlah relatif sel kelompok kontrol sehat sebesar 31,62%, lalu terjadi kenaikan pada kelompok kontrol sakit menjadi 41,22%. Terjadinya kenaikan jumlah sel tersebut dikarenakan adanya infeksi dari bakteri *E. coli* pada hewan coba, akan tetapi infeksi tersebut belum mampu menaikkan jumlah relatif sel secara signifikan ($p>0.05$). Hal ini dikarenakan kurangnya nilai konsentrasi dan volume *E. coli* yang injeksikan pada hewan coba untuk memicu terjadinya respon inflamasi pada *bone marrow*.

Nilai jumlah relatif sel yang tidak berbeda nyata antara kelompok perlakuan sehat dan kelompok sakit bisa disebabkan oleh dua faktor. Faktor yang pertama ialah dosis sedangkan faktor yang kedua ialah volume injeksi. Penelitian ini menggunakan injeksi intraperitoneal dengan volume 0,1 ml dan dosis sebesar 10^7 . Penelitian sebelumnya menyebutkan nilai *lethal dose* bakteri *E. coli* sebesar 10^8 cfu/ml (Hori dkk., 2018). Beberapa penelitian lain menggunakan dosis yang lebih tinggi yaitu 10^9 CFU/ml dengan injeksi intraperitoneal dan volume yang digunakan sebesar 0.2 ml (Gu dkk., 2015). Berdasarkan hal tersebut dosis dan volume injeksi *E. coli* yang digunakan pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan dua penelitian yang telah disebutkan di atas.

Peningkatan jumlah granulosit pada *bone marrow* disebabkan karena adanya sitokin inflamasi karena infeksi *E. coli*. Adanya sitokin ini akan menyebabkan sel induk pada *bone marrow* akan lebih cenderung membelah membentuk progenitor myeloid yang

akan membentuk sel granulosit dibandingkan progenitor limfosit (Mirantes dkk., 2014), akan tetapi pada penelitian ini peningkatan jumlah relatif sel kelompok kontrol sakit tidak berbeda nyata dengan kontrol sehat. Apabila jumlah *E. coli* yang diinjeksikan terlalu rendah maka sitokin yang terbentuk pun juga tidak akan meningkat levelnya secara signifikan. Hal tersebut menyebabkan progenitor juga tidak membelah secara signifikan untuk membentuk progenitor myeloid selaku induk sel granulosit.



Gambar 6. Jumlah relatif sel GR1⁺ pada *bone marrow* di hari ke-8 dan ke-16 kebuntingan

Berdasarkan penelitian ini diketahui pula bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan yang diberi kombinasi ekstrak dengan kontrol sakit ataupun kontrol sehat, akan tetapi pada kelompok perlakuan P2 berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif pada hari ke-8 kebuntingan. Jumlah relatif sel pada kelompok kontrol sehat sebesar 30,72% sedangkan pada kelompok

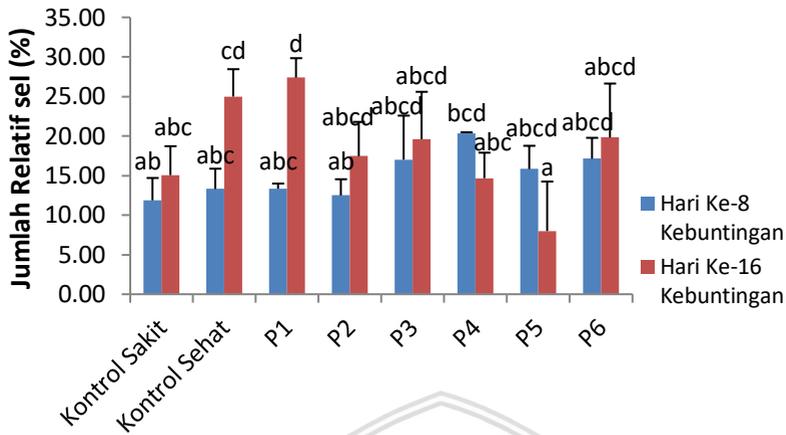
perlakuan P2 sebesar 46,75%. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah GR1⁺ dibandingkan kelompok kontrol sehat.

Kenaikan tersebut berkaitan dengan kondisi fisiologis pada masa kehamilan. Pada masa kehamilan akan terjadi peningkatan jumlah granulosit terutama sel neutrofil, sementara sel limfosit akan berkurang. Hal tersebut bertujuan untuk mempertahankan bayi pada masa kehamilan (Chandra dkk., 2018).

4.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi Sel TER119⁺VLA4⁺

Sel TER119⁺VLA4⁺ merupakan salah satu parameter yang dikaji pada penelitian ini. Sel TER119⁺VLA4⁺ merupakan *marker* dari eritrosit yang belum mengalami pematangan di *bone marrow*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah relatif sel pada kelompok kontrol sakit mengalami penurunan jumlah dibandingkan kelompok kontrol sehat baik pada hari ke-8 kebuntingan dan hari ke-16 kebuntingan. Jumlah relatif sel kelompok kontrol sehat pada hari ke-8 kebuntingan sebesar 13% sedangkan pada kelompok kontrol sakit sebesar 11%, akan tetapi nilai tersebut tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Jumlah relatif sel pada hari ke 16 kebuntingan kelompok kontrol sehat sebesar 24% kemudian mengalami penurunan pada kelompok kontrol sakit menjadi 15%, akan tetapi nilai tersebut juga tidak berbeda nyata (Gambar 7). Penyebabnya ialah seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa dosis dan volume injeksi *E. coli* yang digunakan kurang mampu menginduksi respon inflamasi di *bone marrow*.

Ekspresi sel TER119⁺VLA4⁺ pada kelompok perlakuan P1 (*E. scaber* 100%) mengalami kenaikan dibandingkan dengan kelompok kontrol sakit ($P < 0.05$) pada hari ke-16 kebuntingan. Jumlah relatif sel kelompok perlakuan P1 pada hari ke-16 kebuntingan sebesar 27%, kemudian jumlah ini cenderung mengalami penurunan pada kelompok perlakuan ekstrak yang lain dan penurunan tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan P5 dengan nilai 8% (*S. androgynus* 100%). Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan jumlah relatif sel TER119⁺VLA4⁺ dipengaruhi oleh ekstrak *E. scaber* dibandingkan ekstrak *S. androgynus*. Kenaikan ini hanya terjadi pada kebuntingan hari-16, artinya pada awal kehamilan pengaruh ekstrak ini belum terlihat dengan jelas.

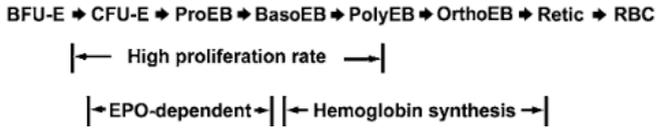


Kelompok Perlakuan

Gambar 7. Jumlah relatif sel TER119⁺VLA4⁺ pada *bone marrow* di hari ke-8 dan ke-16 kebuntingan

Ekstrak *E. scaber* diketahui memiliki kandungan zat besi (Fe) yang cukup tinggi. Kandungan zat besi (Fe) tanaman ini ialah sebesar 45,4 %. Fe merupakan ion yang sangat diperlukan dan memiliki peran penting dalam proses eritropoiesis (Djati dkk., 2015). Fe berperan dalam pembentukan hemoglobin selama proses eritropoiesis (Li & Ginzburg, 2010). Hemoglobin diperlukan pada saat perkembangan eritroblas dan retikulosit (Gambar 8), sehingga akumulasi Fe juga sangat diperlukan dalam perkembangan tersebut (Koury & Ponka, 2004).



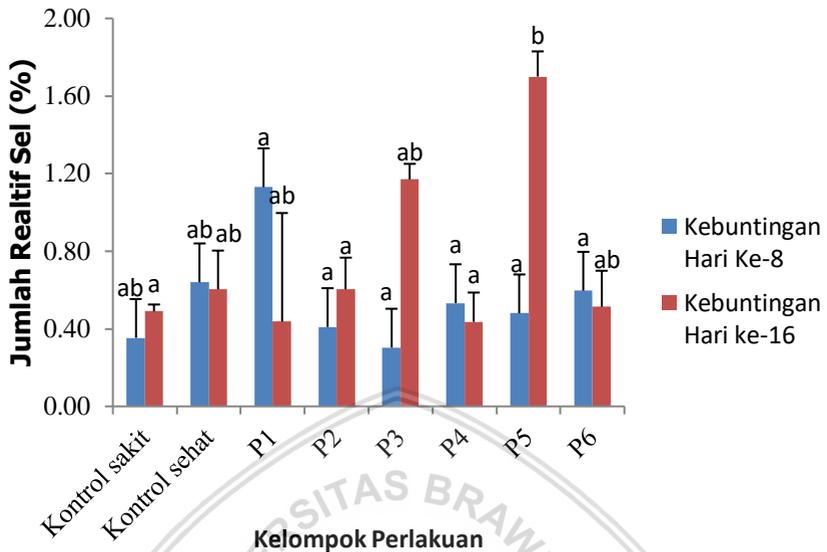


Gambar 8. Tahapan perkembangan dan diferensiasi erithroid

4.3 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi Sel TER119⁺CD34⁺

TER119 merupakan *marker* dari sel eritrosit. *Marker* ini akan terekspresikan pada permukaan sel, sehingga *marker* tersebut bisa digunakan untuk menganalisis sel eritroid dalam tubuh (Zhang, 2011). Selain TER119, *marker* yang bisa digunakan untuk menganalisis progenitor sel darah ialah CD34. *Marker* CD34 merupakan fosfoglikoprotein transmembran yang pertama kali diidentifikasi pada *hematopoietic stem* dan sel progenitor. Sebagian besar CD34 digunakan sebagai *marker* dari *hematopoietic stem cells* (HSC) lain (Sidney dkk., 2014), akan tetapi *marker* ini juga bisa terekspresikan pada permukaan sel progenitor yang seperti sel darah merah (Bersenev, 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah relatif kelompok kontrol sakit tidak berbeda nyata dengan nilai kelompok kontrol sehat. Nilai yang tidak signifikan ini menunjukkan bahwa injeksi bakteri *E. coli* yang digunakan pada penelitian ini belum mampu menyebabkan perubahan ekspresi yang signifikan pada sel TER119⁺CD34⁺ pada kedua kelompok perlakuan tersebut. Hasil penelitian juga menunjukkan kelompok perlakuan dengan kombinasi katuk (*S. androgynus*) 100% (P5), pada hari ke-16 kebuntingan mampu meningkatkan jumlah relatif sel TER119⁺CD34⁺ secara signifikan sebesar 1,17%, akan tetapi pada hari 8 kebuntingan pengaruh ekstrak belum terlihat secara signifikan (Gambar 9).



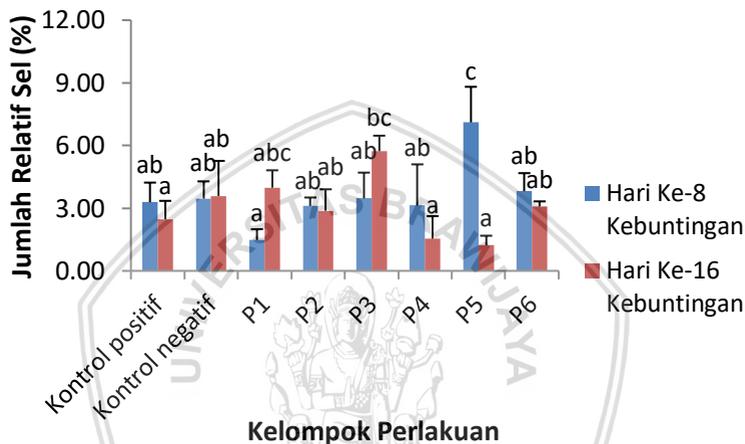
Gambar 9. Jumlah relatif sel TER119⁺CD34⁺ pada *bone marrow* di hari ke-8 dan ke-16 kebuntingan

Peningkatan jumlah relatif sel TER119⁺CD34⁺ pada kelompok perlakuan P5 (*S. androgynus* 100%) di hari ke-16 kebuntingan bisa dikarenakan kandungan ekstrak dari katuk. Ekstrak katuk diketahui memiliki kandungan senyawa flavonoid yang tinggi (Bunawan dkk., 2015). Menurut Zheng dkk. (2011) senyawa flavonoid mampu menginduksi ekspresi dari hormon Eritropoietin (Epo). Hormon Epo merupakan komponen yang sangat penting dalam proses eritropoiesis. Pada tahap awal perkembangan eritrosit Epo sangat diperlukan oleh progenitor sel darah merah.

4.2 Pengaruh Kombinasi Ekstrak pada Ekspresi Sel B220⁺SDF-1⁺

Sel B220⁺SDF-1⁺ merupakan *marker* dari sel limfosit B yang sedang berkembang di dalam *bone marrow*. Hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa ekspresi sel B220⁺SDF-1⁺ pada kontrol sakit dan sehat juga tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 10). Penjelasan sebelumnya telah menyebutkan bahwa hal ini disebabkan dosis dan volume injeksi *E. coli* yang digunakan pada penelitian ini belum mampu menstimulasi inflamasi pada *bone marrow*.

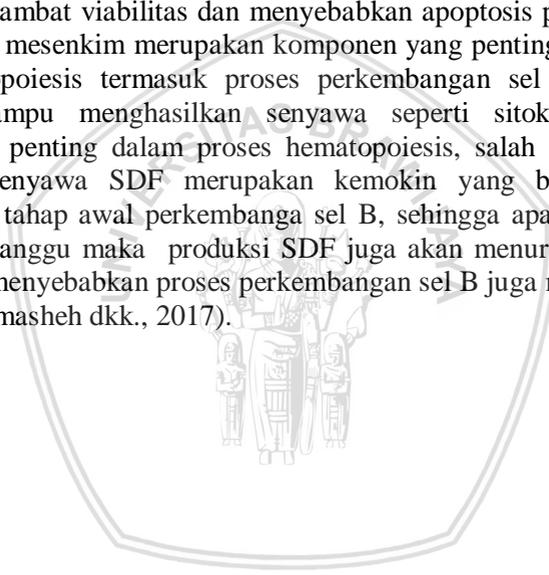


Gambar 10. Jumlah relatif sel B220⁺SDF-1⁺ pada *bone marrow* di hari ke-8 dan ke-16 kebuntingan

Pemberian kombinasi ekstrak pada semua kelompok perlakuan tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol ($P > 0,05$) kecuali pada kelompok perlakuan P5 (*S. androgynus* 100%) di hari ke-8 kebuntingan. Jumlah relatif sel B220⁺SDF-1⁺ pada kelompok tersebut sebesar 7,1% dan berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak katuk (*S. androgynus*) memiliki pengaruh yang lebih signifikan dibandingkan dengan ekstrak pada tapak liman (*E. scaber*). Katuk merupakan tanaman yang mengandung beberapa senyawa seperti tanin, saponin, flavonoid dan papeverin (Djati dkk., 2016). Saponin merupakan

golongan steroid yang memiliki kemampuan untuk menstimulasi imun sistem. Saponin memiliki aktivitas mitogenik dan dapat menginduksi proliferasi dari sel B dan sel T (Rajput dkk., 2007). Peningkatan jumlah sel B220⁺SDF-1⁺ ini hanya terjadi pada kelompok perlakuan P5 di hari ke-8 kebuntingan, akan tetapi pada hari ke 16 kebuntingan kelompok kontrol P5 mengalami penurunan yang berbeda nyata dengan hari ke-8 kebuntingan. Jumlah sel B220⁺SDF di hari ke-16 kebuntingan sebesar 1, 23%.

Penurunan jumlah sel di hari ke 16 kebuntingan bisa disebabkan oleh senyawa lain yang terakumulasi di hari ke-16 kebuntingan. Menurut Yunita dkk. (2012) ekstrak katuk memiliki senyawa yang mampu menghambat viabilitas dan menyebabkan apoptosis pada sel mesenkim. Sel mesenkim merupakan komponen yang penting dalam proses hematopoiesis termasuk proses perkembangan sel B. Sel mesenkim mampu menghasilkan senyawa seperti sitokin dan kemokin yang penting dalam proses hematopoiesis, salah satunya ialah SDF. Senyawa SDF merupakan kemokin yang berperan penting dalam tahap awal perkembangan sel B, sehingga apabila sel mesenkim terganggu maka produksi SDF juga akan menurun. Hal tersebut akan menyebabkan proses perkembangan sel B juga menjadi terhambat (Aqmasheh dkk., 2017).



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pemberian kombinasi ekstrak etanol daun tapak liman (*E. scaber*) dan daun katuk (*S. androgynus*) memiliki pengaruh yang berbeda pada sel-sel hematopoietik. Pemberian kombinasi ekstrak tidak memberikan efek yang berbeda nyata pada sel GR1⁺ antar kelompok perlakuan. Pemberian kombinasi ekstrak dengan kelompok perlakuan P5 (*S. androgynus* 100%) mampu meningkatkan jumlah relatif sel B220⁺SDF-1⁺ pada hari ke-8 kebuntingan dan sel TER119⁺CD34⁺ pada hari ke-16 kebuntingan. Jumlah relatif sel TER119⁺VLA4⁺ meningkat pada kelompok perlakuan P1 (*E. scaber* 75% + *S. androgynus* 25%) pada hari ke-16 kebuntingan.

5.2 Saran

Penelitian yang menggunakan agen infeksi berupa bakteri *E. coli* sebaiknya meningkatkan dosis atau volume injeksi bakteri tersebut. Dosis masing-masing ekstrak sebaiknya ditingkatkan untuk melihat pengaruh ekstrak lebih signifikan. Penelitian selanjutnya akan lebih baik jika menambahkan uji HPLC untuk mengetahui secara pasti kandungan senyawa dari masing-masing ekstrak

DAFTAR PUSTAKA

- Achebe, M. M. & A Gafter-Gvil. 2017. How I treat anemia in pregnancy: iron, cobalamin, and folate. *Blood*. 129(8):940-949.
- Aghababian, R. V. 2011. **Essentials Of Emergency Medicine**. Jones & Bartlett. Burlington.
- Aqmasheh, S., K. Shamsasanjan, P. Akbarzadehlaleh, D. P. Sarva & H. Timari. 2017. Effects of mesenchymal stem cell derivatives on hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Adv Pharm Bull*. 7(2): 165-177.
- Aslam, M. S., M. S. Ahmad & A. S. Mamat. 2015. Anti-microbial potential of *Elephantopus scaber*: An Update Review. *Ind Res J Pharm & Sci*. 7(2015):315-322.
- Beatty, C. D., T. L. Franklin, Y. Uehara & C. B. Wilson. 1994. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur. J. Immunol*. 24:1278-1284.
- Bersenev, A. 2011. CD34 as a surrogate marker for hematopoietic stem and progenitor cells. <http://stemcellassays.com/>. Diakses 5 Juli 2018.
- Bunawan, H., S. N. Bunawan, S. N. Baharum & N. M. Noor. 2015. *Sauropus androgynus* (L.) Merr. induced bronchiolitis obliterans: from botanical studies to toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015:1-7.
- Bunn, H. F. & J. C. Aster. 2011. **Pathophysiology of Blood Disorders**. McGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Burberry, A., M. Y. Zeng, L. Ding, I. Wicks, N. Inohara, S. J. Morrison & G. Núñez. 2014. Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and toll-like receptor signaling. *Cell Host Microbe*. 15:779–791.
- Chandra, S., A. K. Tripathi, S. Mishra, M. Amzarul & A. K. Vais. 2012. Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 28(3):144–146..
- Cornelissen, C. N., R. A. Harvey & B. D. Fisher. 2013. **Microbiology**. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Daley J. M., A. A. Thomay, M. D. Connolly, J. S. Reichner & J. E. Albina. 2008. Use of ly6g-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*. 83:64-70.

- Dalimartha, S. 2007. **Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Volume 3**. Puspa Swara. Jakarta.
- Djati, M. S. 2017. Implementing 'bio-prospecting reproductive knowledge': an effort scenario to conserved Indonesian biodiversity and endemism toward a post-modern globalized world. *AIP Conference Proceedings* 1985: 020002.
- Djati, M. S., D. R. Dwijayanti & M. Rifa'i. 2015. Synergetic modulation of T lymphocyte and Ter119⁺ cell using combination of *Elephantopus scaber* and *Polyscias obtusa* extract in pregnant mice after *Salmonella Typhi* infection. *Int J Pharm Bio Sci.* 6(4): 1228 – 1234.
- Djati, M. S., D. R. Dwijayanti & M. Rifa'i. 2016. Herbal supplement formula of *Elephantopus scaber* and *Sauropus androgynus* promotes IL-2 cytokine production of CD4⁺ T cells in pregnant mice with typhoid fever. 11(1): 211–219.
- Djati, M.S., Y. A. Rahma, D. R. Dwijayanti & M. Rifai, S. Rahayu. 2017. synergistic effect of *Elephantopus scaber* L and *Sauropus androgynus* L. Merr extracts in modulating prolactin hormone and erythropoiesis in pregnant typhoid mice. *Trop J Pharm Res.* s16(8):1789.
- Gabrilovich, D. 2013. **The Neutrophils: New Outlook for Old Cells**. Wiley-Blackwell. Hoboken.
- Gayathamma, K., K.V. Pavani, R. Raji. 2012. Chemical constituents and antimicrobial activities of certain plant parts of *Sauropus androgynus*. L. *Int J Pharma. Bio. Sci.* 3(2):561-566.
- Goldman, E. & L. H. Green. 2015. **Practical Handbook of Microbiology, Third Edition**. CRC Press. Boca Raton.
- Greenhill, C. J., S. Rose-John, R. Lissilaa, W. Ferlin, M. Ernst, P. J. Hertzog, A. Mansell & B. J. Jenkins. 2011. IL-6 *trans*-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *J Immunol.* 186(2):1199-1208.
- Gu, M., N. Zhang, L. Zhang, M. Xiong, Y. Yang, X. Gu, X. Shen & H. Ding. 2015. Response of a clinical *Escherichia coli* strain to repeated cefquinome exposure in a piglet tissue-cage model. *BMC Veterinary Research.* 11:169.
- Hannon, R. A., C. Pooler & C. M. Porth. 2009. **Porth Pathophysiology: Concepts of Altered Health States**. Lippincott Williams & Wilkins. New York.

- Hawley, T. S. & R. G. Hawley. 2004. **Flow Cytometry Protocols**. Human Press. Totowa.
- Hiradeve, S. M. & V. D. Rangari. 2014. *Elephantopus scaber* Linn.: a review on its ethnomedical, phytochemical and pharmacological profile. *J Appl Biomed*. 28(11):819-830.
- Ho, W. Y., H. Ky, S. K. Yeap, R. A. Rahim, A. R. Omar, C. L. Ho & N. B. Alitheen. 2009. Traditional practice, bioactivities and commercialization potential of *Elephantopus scaber* Linn. *J. Med. Plant. Res*. 3(13):1212-1221.
- Hoffbrand, A. V., D. R. Higgs, D. M. Keeling & A. B. Mehta. 2016. **Postgraduate Haematology**. John Wiley & Son. Hoboken.
- Hori, Y., Y. Nihei, Y. Kurokawa, A. Kuramasu, Y. Makabe-Kobayashi, T. Terui, H. Doi, S. Satomi, E. Sakurai, A. Nagy, T. Watanabe & H. Ohtsu. 2018. Accelerated clearance of *Escherichia coli* in experimental peritonitis of histamine-deficient mice. *Jimmunol*. 169:1978-1983.
- Jamieson, D. J., R. N. Theiler & S. A. Rasmussen. 2006. Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis*. 12(11):1638–1643.
- Kabeer, F.A. & R. Prathapan . 2014. Phytopharmacological profile of *Elephantopus scaber*. *Pharmacologia*. 5(8):272-285.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro & H. L. T.Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Riview*. 2:123-140.
- Keating, A., K. Dicke, N. Gorin, R. Weber, H. Graf. 2005. **Regenerative and Cell Therapy: Clinical Advances**. Springer Science & Business Media. Berlin.
- Keohane, E., L. Smith & J. Walenga. 2016. **Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications**. Elsevier. St. Louis
- Kondo, M. 2010. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev*. 238(1):37–46.
- Koury, Mark J & Prem Ponka. 2004. NEW INSIGHTS INTO ERYTHROPOIESIS :The roles of folate,vitamin b12, and iron. *Annu. Rev. Nutr*. 4: 31-105.
- Kovtonyuk, L. V., K. Fritsch, X. Feng, M. G Manz & H. Takizawa. 2016. Inflamm-aging of hematopoiesis, hematopoietic stem cells, and the bone marrow microenvironment. *Front. Immunol*. 7:502.
- Li, H & Y. Z. Ginzburg. 2010. Crosstalk between iron metabolism and erythropoiesis. *Adv Hematol*. 2010:12.

- Marone, G., L. M. Lichtenstein & F. J. Galli. 2000. **Mast Cells and Basophils**. Academic Press. London.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *NATURE*. 454:428-435.
- Mirantes, C., E. Passequé & E. M. Pietras. 2014. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating hsc function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp Cell Res*. 329(2):248–254.
- Parveen, K., A. Momen, A. A. Begum & M. Begum. 2011. Prevalence of urinary tract infection during pregnancy. *J. Dhaka National Med. Coll. Hos*. 17(02):8-12.
- Pierce, C.N. & D.F. Larson. 2005. Inflammatory cytokine inhibition of erythropoiesis in patients implanted with a mechanical circulatory assist device. *Perfusion*. 20:83-90.
- Petrus, A. J. A. 2013. *Sauropus androgynus* (L.) Merrill-A potentially nutritive functional leafy-vegetable. *Asian J. Chem*. 25(17):9425-9433.
- Phillai, S. 2000. **Lymphocyte Development: Cell Selection Events and Signals During Immune Ontogeny**. Birkhäuser. New York
- Rajendram, R., V. R. Preedy & V. Patel. 2013. **Stem Cells and Bone Tissue**. CRC Press. Boca Raton.
- Rajput, Z. I., Song-hua H, Chen-wen X., A. G. Arijo. 2007. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B*. 8(3):153–161.
- Redaksi Agromedia. 2008. **Buku Pintar Tanaman obat: 431 Jenis Tanaman Penggempur Aneka Penyakit**. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Robinson, D. P. & S. L. Klein. 2012. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav*. 62(3):263–271.
- Roseblatt, M. R., M. H. Vuillet-Gaugler, C. Leroy & L. Coulombel. 1991. Coexpression of two fibronectin receptors, α 4 and α 5, by immature human erythroblastic precursor cells. *J. Clin. Invest*. 87: 6-11.
- Seita, J. & I. L. Weissman. 2010. hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2(6):640–653.
- Shalini, V., S. Bhaskar, K. S. Kumar, S. Mohanlal, A. Jayalekshmy & A. Hele. 2012. Molecular mechanisms of anti-inflammatory

- action of the flavonoid, tricetin from Njavara rice (*Oryza sativa* L.) in human peripheral blood mononuclear cells: Possible role in the inflammatory signaling. *Int Immunopharmacol.* 14(1):32-38.
- Sidney, L. E., M. J. Branch, S. E. Dunphy, H. S. Dua & A. Hopkinson. 2014. concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 32(6): 1380–1389.
- Singh, V. K., A. Saini, M. Kalsan, N. Kumar & R. Chandra. 2016. Stage-Specific regulation of erythropoiesis and its implications in ex - vivo RBCs generation. *J Stem Cell.* 11(3):149-169.
- Soromou, L. W., Z. Zhang, R. Li, N. Chen, W. Guo, M. Huo, S. Guan, J. Lu & X. Deng. 2012. Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-*o*-methyl-naringenin. *Molecule.* 17(3):3574-85.
- Subramoniam, A. 2016. **Plants with Anti-Diabetes Mellitus Properties.** CRC Press. Boca Raton.
- USDA, NRCS. 2017. The PLANTS Database. <http://plants.usda.gov>. Diakses tanggal 12 November 2017.
- Wang, J., P. Li, B. Li, Z. Guo, E. J. Kennelly & C. Long. 2014. Bioactivities of compounds from *Elephantopus scaber*, an ethnomedicinal plant from Southwest China. *eCAM.* 2014:1-7.
- Wei, L. S., W. Wee, J. Y. F. Siong, D. F. Syamsumir. 2011. Characterization of antimicrobial, antioxidant, anticancer properties and chemical composition of *Sauropus androgynus* stem extract. *Acta Med Litu.* 18: 12-16.
- Weiss, G. & L. T. Goodnough. 2005. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med.* 352(10):1011-1023.
- Weiss, G. & C. Gasche. 2010. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica.* 95(2):175–178.
- Yunita, O., M. Yuwono & F. A. Rantam. 2013. In Vitro cytotoxicity assay of *sauropus androgynus* on human mesenchymal stem cells. *Environ Toxicol Chem.* 95(4): 679-686.
- Zhang, L. 2011. **Heme Biology: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes.** World Scientific Publishing. Singapura.
- Zheng, K.Y., R.C. Choi, A.W. Cheung, A.J. Guo, C.W. Bi, K.Y. Zhu, Q. Fu, Y. Du, W.L. Zhang, J.Y. Zhan, R. Duan, D.T. Lau, T.T Dong., K.W. Tsim. 2011. Flavonoids from Radix Astragali

induce the expression of erythropoietin in cultured cells: a signaling mediated via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Agric Food Chem.* 59(5):1697-704.

