



**FRAKSINASI EKSTRAK n-HEKSAN DAN UJI EFEK PENINGKATAN
AKTIVITAS LEUKOSIT MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN DARI DAUN
PARRANG ROMANG (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill).**

**ANDRE YUDHINATA SESA
N11105625**



PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. Terima	15 - 12 - 09
Asal Dari	fa. suani
Banyaknya	1 dus
Harga	status
No. Inventaris	69
No. Klas	

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

**FRAKSINASI EKSTRAK n-HEKSAN DAN UJI EFEK PENINGKATAN
AKTIVITAS LEUKOSIT MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN DARI DAUN
PARRANG ROMANG (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill).**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**ANDRE YUDHINATA SESA
N11105625**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

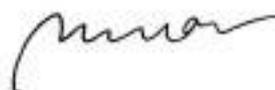
FRAKSINASI EKSTRAK n-HEKSAN DAN UJI EFEK PENINGKATAN
AKTIVITAS LEUKOSIT MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN DARI DAUN
PARRANG ROMANG (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill).

ANDRE YUDHINATA SESA

N11105625

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



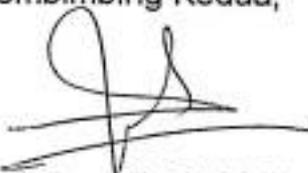
Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002

Pembimbing Pertama,



Mufidah, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19730309 199903 2 002

Pembimbing Kedua,



Subehan, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19750925 200112 1 002

Pada tanggal,

2009

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan pada Tuhan Yesus Kristus karena atas kasih anugrah, dan penyertaan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi di Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak rintangan dan hambatan yang dihadapi, namun dengan doa dan bantuan dari berbagai pihak, skripsi ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, perkenankanlah penulis mengungkapkan rasa terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada Ibu Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt. selaku penasehat akademik dan pembimbing utama yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama mengikuti perkuliahan serta dalam penyelesaian skripsi, Ibu Mufidah, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing pertama dan Bapak Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt selaku pembimbing kedua yang ditengah kesibukannya masih meluangkan waktu dan kesempatannya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran dan pikiran kepada penulis sejak perencanaan penelitian hingga selesainya skripsi ini.

Penulis juga ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada Dekan, Pembantu Dekan I, Pembantu Dekan II Fakultas Farmasi; Bapak / Ibu Dosen Fakultas Farmasi, terkhususnya Ibu Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt yang telah banyak memberikan dukungan, petunjuk dan

bimbingannya kepada penulis, seluruh Kepala Laboratorium dan seluruh staf serta pegawai Fakultas Farmasi, terkhusus pada Ibu Adriana Pidun, Pak Suaib, dan Kak Cia.

Teramat Khusus, rasa hormat, bangga dan terima kasih yang tak terhingga juga penulis sampaikan kepada *ayahanda Ir. Yan Radda Sesa* dan *ibunda Made Fice* yang selalu memberikan doa yang tulus, kasih sayang, nasehat, motivasi, dan dukungan material selama menempuh pendidikan dibangku kuliah, hingga selesainya penyusunan skripsi ini. begitupula dengan adikku (Elvira Novianti Sesa, Indri Mayasari Sesa, dan Windy Christine Sesa) yang selalu mendoakan dan menjadi pembangkit semangat, termasuk seluruh kerabat keluarga yang telah banyak membantu selama menghadapi dunia perkuliahan. Dan special thank's to *Jeane Fermita Rorimpandey* buat doa, kasih sayang, semangat dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama ini.

Kepada rekan-rekan mahasiswa Farmasi angkatan 2005, khususnya buat teman cowok (K'Bagus, K'Jufri, Rio, Dani, Felix, Dewa, Jerpi, Restu, Wahyu), teman angkatan 2005, serta K'Donald dan Lukman (thanks buat bantuan dan kerja sama dalam penyelesaian penelitian) terima kasih atas bantuan dan kebersamaannya dalam suka dan duka selama penulis menuntut ilmu serta dalam penyelesaian skripsi ini. Begitu pula kepada kepada Sahabat-sahabat di PMKO FILADELFIA FAK. MIPA-FARMASI yang selalu mendukungku dalam doa. Terutama buat K'Elson, Joni, Marina, Leksi, Yosep, Rezky, Alnes, Cikka, Gracety, Okta, Eda, Oca

Alfons n' Nelson dkk, Febby,Prisca dkk, Dita,Yulin,Tiur, Tessa, Yenti, Yondri, chaken dkk, Alfred dkk, dan semuanya yang tidak penulis sebutkan. Buat Kelompok PA EL SHABAK, saudaraku yang sangat kukasihi K'Elson (thank's for advice n' inspiring me, still faithful to serve GOD JC), Leksi, Felix, Gerson, dan Rifki, terimakasih buat doa dan kebersamaannya.

Penulis sadar skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, kata pepatah "Tak ada gading yang tak retak". Di dunia tak ada satupun yang sempurna karena kesempurnaan hanya milik-Nya. Maka dari itu saran dan kritik membangun sangat penulis harapkan guna tambahan wawasan agar dalam pengerjaan penelitian selanjutnya dapat lebih baik.

Akhirnya semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan terutama di bidang farmasi, Amin.

Makassar, 2009

Andre Yudhinata Sesa

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang fraksinasi dan uji efek peningkatan aktivitas leukosit mencit (*Mus musculus*) jantan dari ekstrak n-heksan daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek hasil fraksinasi ekstrak n-heksan daun parrang romang terhadap aktivitas leukosit dengan melihat peningkatan jumlah leukosit total. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut metanol dan selanjutnya dipartisi dengan heksan, hingga diperoleh ekstrak n-heksan. Ekstrak n-heksan difraksinasi dengan kolom kromatografi cair vakum. Semua fraksi dimonitor komponen kimianya dan digabung berdasarkan pada kesamaan profil KLT. Fraksi gabungan tersebut diuji efek peningkatan aktivitas leukositnya. Mencit jantan dibagi dalam 22 kelompok, yaitu kelompok I diberi perlakuan suspensi levamisol sebagai kontrol positif, kelompok II yang diberi larutan koloidal Natrium CMC 1% b/v sebagai kontrol negatif dan kelompok III sampai XXII diberi suspensi fraksi-1, -2, -3, -4 dan -5 dengan dosis 100, 50, 16, dan 8 µg/g BB mencit secara oral selama 12 hari. Pengamatan dilakukan terhadap sampel darah dengan melihat kenaikan jumlah leukosit total sebelum dan sesudah perlakuan. Perhitungan jumlah leukosit total dilakukan dengan metode kamar hitung dengan menggunakan larutan Turk. Berdasarkan hasil analisis statistik dengan menggunakan metode Rancangan Faktorial dan dilanjutkan dengan uji beda jarak nyata Duncan diperoleh bahwa fraksi 1 dengan dosis 100, 50 dan 8 µg/gBB mencit, fraksi 2 dengan dosis 100, 50, 16, dan 8 µg/gBB mencit, fraksi 3 dengan dosis 100, 50, 16, dan 8 µg/gBB mencit, fraksi 4 dengan dosis 16 µg/gBB, fraksi 5 dengan dosis 100, 50, dan 8 µg/gBB mencit, dapat meningkatkan jumlah leukosit total dengan aktivitas tertinggi terjadi pada fraksi 3 dosis 8 µg/g BB. Peningkatan tertinggi terjadi setelah hari ke 4 setelah perlakuan.

ABSTRACT

Fractination of n-hexan extract of parrang romang leaves (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) and evaluation it's effect on the enhancement leukocyte activity in male mice (*Mus musculus*) had been conducted. The research was aimed to know about effect of fractionation result n-hexan extract to enhance immune system with pharameter increasing of the total leukocyte. The extraction was done by maceration with methanol and then be partioned by n-hexan until produced the n-hexan extract. The n-hexan extract then fractionated by column vacuum liquid chromatography. The chemical compound of all fractions were monitored by TLC and then mixed based on the similarity of TLC profile. Fractions were tested for enhancement leukocyte activity. The male mice was divided into 22 treatment groups, where each group consisted of 3 mice. The first group as positive control administrated with levamisole suspension, second group as negative control which was only administrated with Sodium CMC 1% w/v, and the others group were administrated fraction 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th with dose 100; 50; 16; and 8 µg/g BW mice, respectively, during twelve days orally. Observation by cheking total leukocyte increasing in blood before and after administration compared to positive control group. The leukocyte total counts were obtained by haemocytometer method with Turk solution. Base on statistical analysis by Factorial Experimental Design followed by Duncan's Multiple Range Test Method indicate that fraction1st at dose 100; 50; and 8 µg/g BW mice, fraction2nd at dose 100; 50; 16; and 8 µg/g BW mice, fraction3rd at dose 100; 50; 16; and 8 µg/g BW mice, fraction4th at dose 16 µg/g BW mice and fraction5th at dose 100; 50; and 8 µg/g BW mice could increasing total leukocyte with optimum activity on fraction3rd at dose 8 µg/g BW mice. High increasing was occured on fourth day after administration.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Uraian Tanaman.....	4
II.1.1 Klasifikasi Tanaman.....	4
II.1.2 Nama Daerah	4
II.1.3 Morfologi Tanaman.....	4
II.2 Metode Ekstraksi	5
II.2.1 Ekstrak dan Ekstraksi	5
II.2.2 Maserasi	5
II.3 Metode Pemisahan.....	6
II.3.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	6
II.3.2 Kromatografi Cair Vakum	7

II.4 Uraian Tentang Leukosit.....	8
II.4.1 Pembentukan Leukosit.....	9
II.4.1.1 Tempat Terjadinya Hematopoiesis.....	9
II.4.1.2 Sel Induk, Diferensiasi dan Faktor Pertumbuhan.....	11
II.4.1.3 Pematangan Granulosit.....	12
II.4.1.4 Pematangan Limfosit dan Monosit.....	13
II.4.2 Jenis-Jenis Leukosit.....	14
II.4.2.1 Leukosit Granular.....	15
II.4.2.2 Leukosit Agranular.....	19
II.5 Immunologi Kanker.....	29
II.5.1 Respon Sistem Imun Terhadap Sel Kanker.....	29
II.5.1.1 Imunitas Humoral Terhadap Kanker.....	29
II.5.1.2 Imunitas Seluler Terhadap Kanker.....	30
II.5.2 Surveillance Imunitas.....	32
II.5.3 Immunological Escape.....	33
II.6 Hitung Leukosit Total.....	34
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	36
III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan.....	36
III.2 Penyiapan Sampel Penelitian.....	36
III.2.1 Penyiapan Sampel.....	36
III.2.2 Ekstraksi Sampel.....	37
III.2.3 Partisi Pelarut.....	37
III.2.4 Isolasi dengan Kolom Kromatografi Cair Vakum.....	38

III.2.4.1 Penyiapan Kolom Kromatografi Cair Vakum	38
III.2.4.2 Penyiapan Sampel Kolom Kromatografi Cair Vakum	38
III.2.4.3 Fraksinasi Komponen Kimia	38
III.3 Pembuatan Sediaan Uji	39
III.3.1 Pembuatan Larutan Koloidal Na CMC 1%.....	39
III.3.2 Pembuatan Suspensi Levamisol.....	39
III.3.3 Pembuatan Suspensi Fraksi.....	39
III.4 Pelaksanaan Uji Efek Peningkatan Aktivitas Leukosit Mencit	40
III.4.1 Penyiapan dan Pemilihan Hewan Uji.....	40
III.4.1.1 Penyiapan Hewan Uji	40
III.4.1.2 Pemilihan Hewan Uji.....	41
III.4.2 Perlakuan Terhadap Hewan Uji	41
III.5 Perhitungan Jumlah Leukosit Total.....	41
III.6 Pengumpulan dan Analisis Data.....	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	43
IV.1 Hasil Pengamatan.....	43
IV.2 Pembahasan	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	52
V.1 Kesimpulan	52
V.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Ukuran dan jumlah leukosit manusia	14
2. Rata-rata jumlah leukosit total/ μ l darah setiap pemberian fraksi parrang romang	43
3. Persentase rata-rata kenaikan leukosit total/ μ l darah setiap pemberian fraksi parrang romang	44
4. Data hasil perhitungan jumlah leukosit total/ μ l darah	63
5. Hasil analisis sidik ragam pengaruh utama dan interaksi sediaan uji dan hari pengamatan terhadap jumlah leukosit	67
6. Perbandingan rata-rata keragaman sediaan uji	68
7. Perbandingan rata-rata keragaman hari	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Gambaran diagram sel induk pluripoten sumsum tulang dan jalur-jalur sel yang berasal darinya	10
2. Pembentukan fagosit neutrofil dan monosit. Eosinofil dan basofil juga dibentuk dalam sumsum tulang dengan suatu proses yang serupa dengan neutrofil	10
3. Kinetika Pembentukan Neutrofil.....	11
4. Jenis-jenis leukosit.....	15
5. Profil kromatografi lapis tipis hasil kromatografi cair vakum ekstrak n-heksan.....	47
6. Grafik perubahan jumlah leukosit total sebelum dan setelah perlakuan	48
7. Profil kromatografi lapis tipis ekstrak metanol awal, ekstrak n-heksan dan bagian tidak larut n-heksan	70
8. Profil kromatografi lapis tipis hasil kromatografi cair vakum dengan penampak noda UV 254, 366 nm dan H ₂ SO ₄ 10%	71
9. Foto larutan Turk.....	72
10. Foto darah yang telah diencerkan dengan larutan Turk sebelum perhitungan jumlah leukosit total.....	72
11. Foto pengamatan jumlah leukosit total	73
12. Foto kamar hitung Improved Neubaur	73
13. Foto tanaman parrang romang	74
14. Daun parrang romang	74

DAFTAR LAMPIRAN



Lampiran	halaman
1. Skema kerja ekstraksi dan fraksinasi daun parrang romang.....	56
2. Skema kerja pengujian efek peningkatan aktivitas leukosit	57
3. Data biologis mencit.....	58
4. Perhitungan konversi dan pembuatan suspensi levamisol.....	59
5. Perhitungan dosis dan pembuatan suspensi fraksi.....	60
6. Perhitungan rendamen	62
7. Analisis statistika data hasil perhitungan jumlah leukosit total	63
8. Gambar-gambar pelaksanaan dan hasil penelitian.....	70
9. Hasil determinasi tanaman parrang romang	75

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti
PMN	Polimorfonuclear
APC	Antigen Presenting Cell
MHC	Major Hiscompatibility Complex
ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxic
NK	Natural Killer
TCR	T Cell Reseptor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Th	T helper
Ts	T supresor
T dth	T delayed type hypersensitivity
Tc	T cytotoxic
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
Ig	Imunoglobulin
BRM	Biological Response Modifier
TNF	Tumor Necrosis Factor

BAB I

PENDAHULUAN

Tanaman Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) termasuk dalam suku Urticaceae, daunnya sering digunakan sebagai obat kanker oleh masyarakat daerah Toraja, Sulawesi Selatan. Mekanisme kerja daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) sebagai antikanker saat ini belum diketahui. Terapi kanker secara konvensional yaitu dengan operasi, radiasi dan obat anti kanker mempunyai efek samping, yaitu immunosupresif atau menurunkan kekebalan tubuh. Hal ini dapat menimbulkan sisa-sisa sel kanker yang masih ada dapat tumbuh lagi dengan cepat. Karena itu terapi imun yang menaikkan kekebalan tubuh dapat mengatasi masalah ini (1).

Menurut penelitian yang telah dilakukan, ekstrak metanol daun Parrang Romang secara signifikan dapat meningkatkan aktivitas antibodi imunoglobulin G (2). Skrining antikanker terhadap sel kanker HeLa telah dilakukan terhadap ekstrak n-heksan daun Parrang Romang. Dari hasil perhitungan metode analisis probit diperoleh nilai IC_{50} 3,453 μ g/ml (3). Dengan IC_{50} yang tinggi menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan daun Parrang Romang memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan menjadi obat anti kanker. Penelitian fraksi n-heksan daun Parrang Romang terhadap peningkatan aktivitas leukosit darah belum dilaporkan. Fraksinasi n-heksan daun Parrang Romang dilakukan untuk mengetahui

fraksi aktif yang dapat meningkatkan aktivitas leukosit darah atau sebagai imunostimulator.

Leukosit atau sel darah putih, adalah sel yang mengandung inti. Leukosit pada umumnya ikut serta dalam pertahanan selular dan humoral organisme terhadap benda asing dan melakukan fungsinya didalam jaringan ikat. Ada dua golongan utama leukosit, yaitu leukosit agranular (limfosit, monosit) dan leukosit granular (neutrofil, basofil, eosinofil) (4).

Kemajuan yang telah dicapai dalam pengembangan berbagai vaksin dan obat-obat yang digunakan untuk memperbaiki sistem imun yang disebut imunstimulator, digunakan untuk memerangi infeksi dan mengobati kanker. Imunostimulator secara tak langsung berkhasiat mereaktivasi sistem imun yang rendah antara lain dengan meningkatkan perbanyakkan limfosit-T, NK cells dan makrofag, dan juga meningkatkan aktivitas sel-sel tersebut untuk pelepasan sitokin (5).

Senyawa-senyawa yang berkhasiat sebagai antikanker memiliki beberapa mekanisme kerja, yaitu sebagai penghambat perkembangan sel dan meningkatkan sistem imun tubuh. Sel kanker dikenal oleh tubuh sebagai bahan asing, respon sistem imun terhadap sel kanker dapat dibagi menjadi 2 yaitu humoral dan seluler. Dimana sistem imun humoral memiliki 2 mekanisme antibodi yang dapat menghancurkan sel kanker, yaitu *Antibodi Dependent Cell Mediated Cytotoxicity* dan *Complement Dependent Cytotoxicity*. Sedangkan sistem imun seluler memiliki 2

mekanisme antibodi terhadap sel kanker, yaitu *Sitotoksitas melalui sel T* dan *Sitotoksitas melalui makrofag* (6).

Sel kanker dikenal sebagai *nonself* yang bersifat antigenik pada sistem imunitas tubuh manusia sehingga ia akan menimbulkan respons imun secara seluler maupun humoral. Peranan imunitas seluler terhadap kanker terlihat pada pemeriksaan patologi-anatomi kanker, sering ditemukan infiltrat sel-sel yang terdiri atas sel fagosit mononuklear, limfosit, sedikit sel plasma dan sel mast. Efektor sistem imun tersebut adalah sel T *cytolytic* (sel Tc), fagosit mononuklear, polimorfonuklear, dan sel *Natural Killer* (sel NK). Aktivasi sel T melibatkan sel T *helper* (sel Th) dan Tc, sel Th penting dalam pengerahan dan aktivasi makrofag dan sel NK. Imunitas humoral lebih sedikit berperan daripada imunitas seluler dalam proses penghancuran sel kanker (6,7).

Berdasarkan uraian tersebut diatas, maka akan dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh fraksi n-heksan daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) terhadap sistem imun melalui peningkatan aktivitas leukosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek hasil fraksi n-heksan daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) terhadap aktivitas leukosit dengan melihat perbanyakan leukosit total sebelum dan sesudah perlakuan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman

II.1.1 Klasifikasi Tanaman

- Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Anak kelas : Monochlamydeae
Bangsa : Urticales
Suku : Urticaceae
Marga : Boehmeria
Jenis : *Boehmeria virgata* Guillem (8,9)

II.1.2 Nama Daerah

- Makassar : Parang romang
Toraja : Bo'to laki

II.1.3 Morfologi Tanaman

Daun ini sangat karakteristik, berbentuk menyerupai jantung (cordatus) dan bagian sisinya bergerigi halus (serratus), panjang 10-20 cm dan lebar 5-15 cm. Daun berwarna hijau muda hingga hijau tua berkilap pada bagian atasnya dan berwarna putih keperak-perakan dan berbulu halus pada bagian punggungnya. Bunganya tergolong majemuk dengan biji sangat kecil. Bunga pada beberapa varietas berwarna putih kehijau-

hijauan disamping ada yang berwarna hijau kekuning-kuningan dan berubah menjadi coklat jika sudah tua. Bunga terikat mengelompok di sela-sela daun pada bagian bawah buku-buku batang (8,9).

II.2 Metode Ekstraksi

II.2.1 Ekstrak dan Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung (10).

Ekstraksi adalah penyarian komponen kimia atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Ragam ekstraksi yang tepat sudah tentu bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi (11).

Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (12).

II.2.2 Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif

yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, stiraks dan lain-lain.

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan (12).

II.3 Metode Pemisahan

Pemisahan dan pemurnian kandungan tumbuhan terutama dilakukan dengan menggunakan salah satu dari empat teknik kromatografi atau gabungan teknik tersebut. Keempat teknik kromatografi itu adalah : *kromatografi kertas (KKt)*, *kromatografi lapis tipis (KLT)*, *kromatografi gas cair (KGC)*, dan *kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)*. Pemilihan teknik kromatografi sebagian besar bergantung pada sifat kelarutan dan keatsirian senyawa yang akan diperiksa (11).

II.3.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah salah satu analisis yang digunakan untuk memisahkan senyawa dengan cepat berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi. Adsorben berupa serbuk halus yang dilapiskan merata dan tipis (0,1-2 mm) di atas lempeng kaca sebagai fase diam dan pelarut pengembang sebagai fase gerak. Karena adanya perbedaan daya serap adsorben terhadap senyawa, maka senyawa akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda (13).

Campuran yang akan dipisah, berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah pelat atau lapisan ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi fase gerak, pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Untuk campuran yang tidak diketahui, lapisan pemisah dan sistem larutan pengembang harus dipilih dengan tepat karena keduanya bekerja sama untuk mencapai pemisahan. Selain itu, hal yang juga penting adalah memilih kondisi kerja yang optimum yang meliputi sifat pengembangan dan atmosfer bejana. (14).

Memilih pelarut untuk kromatografi lapis tipis dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering kita mencoba-coba saja karena waktu yang diperlukan singkat. Sistem yang paling sederhana ialah campuran pelarut organik yang dipakai untuk memusatkan molekul yang mempunyai satu atau dua gugus fungsi (13).

II.3.2 Kromatografi Cair Vakum

Kromatografi Cair Vakum (*Vacuum liquid chromatography = VLC*) adalah bentuk kromatografi kolom yang khususnya berguna untuk fraksinasi kasar terhadap suatu ekstrak dengan cepat. Kolom dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Setelah pemvakuman dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan kembali sampai kering dan siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimasukkan langsung pada bagian atas kolom. atau pada lapisan prapenjerap dan diisap perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan

memvakumkannya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, kolom diisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (15).

II.4 Uraian Tentang Leukosit

Tubuh kita mempunyai suatu sistem khusus untuk memberantas bermacam-macam bahan infeksius dan toksik. Sistem ini terdiri dari atas leukosit darah (sel darah putih) dan sel-sel jaringan yang berasal dari leukosit. Semua sel-sel ini bekerja bersama-sama melalui dua cara untuk mencegah penyakit. Pertama dengan benar-benar merusak bahan yang menyerbu itu melalui proses fagositosis dan yang kedua dengan membentuk antibodi dan limfosit yang peka dimana salah satu atau kedua-duanya dapat menghancurkan atau membuat penyerbu menjadi tidak aktif (16). Lima jenis sel darah putih yang sudah diidentifikasi dalam darah perifer adalah neutrofil, eosinofil, basofil, monosit dan limfosit (17).

Leukosit merupakan *unit yang mobil/aktif* dari sistem pertahanan tubuh. Leukosit ini sebagian dibentuk di sumsum tulang (granulosit dan monosit serta sedikit limfosit) dan sebagian lagi di jaringan limfe (limfosit dan sel-sel plasma). Setelah dibentuk, sel-sel ini diangkut dalam darah menuju bagian tubuh untuk digunakan (16).

Sedikit yang diketahui mengenai fungsi leukosit sewaktu ada dalam aliran darah, yang tampaknya kebanyakan tidak aktif. Leukosit menjalankan sebagian besar fungsinya di luar sistem peredaran darah yaitu memperlihatkan gerakan aktif dan sebagian mempunyai daya

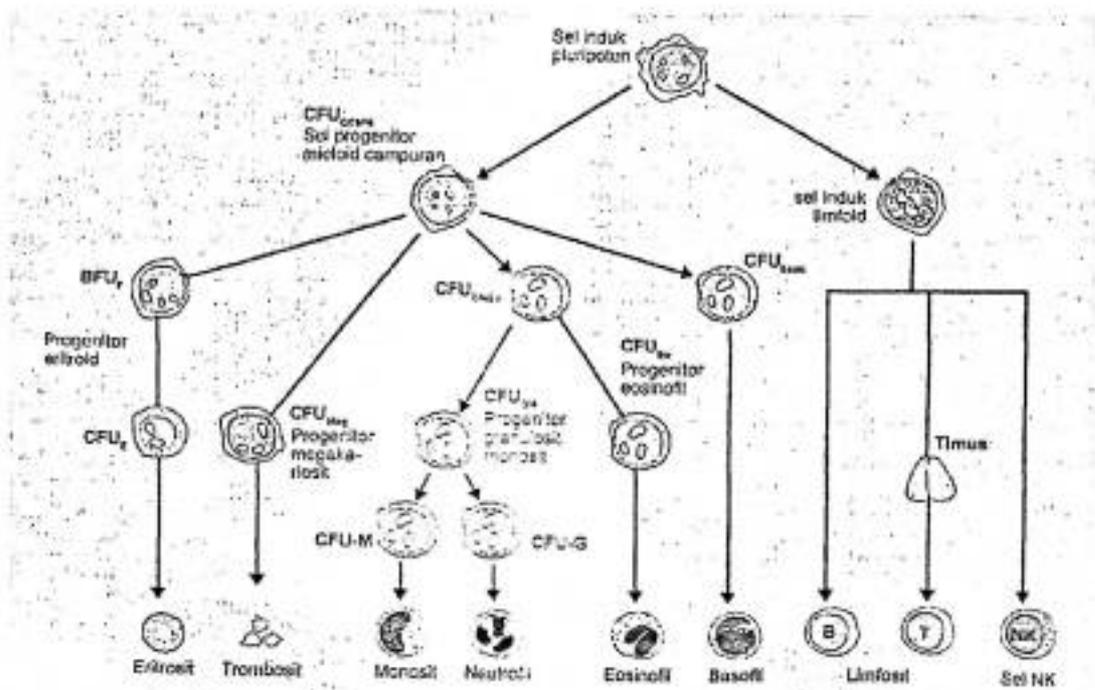
fagositosis. Leukosit pada umumnya ikut serta dalam pertahanan selular dan humoral organisme terhadap benda asing dan melakukan fungsinya dalam jaringan ikat (4).

II.4.1 Pembentukan Leukosit (18,19)

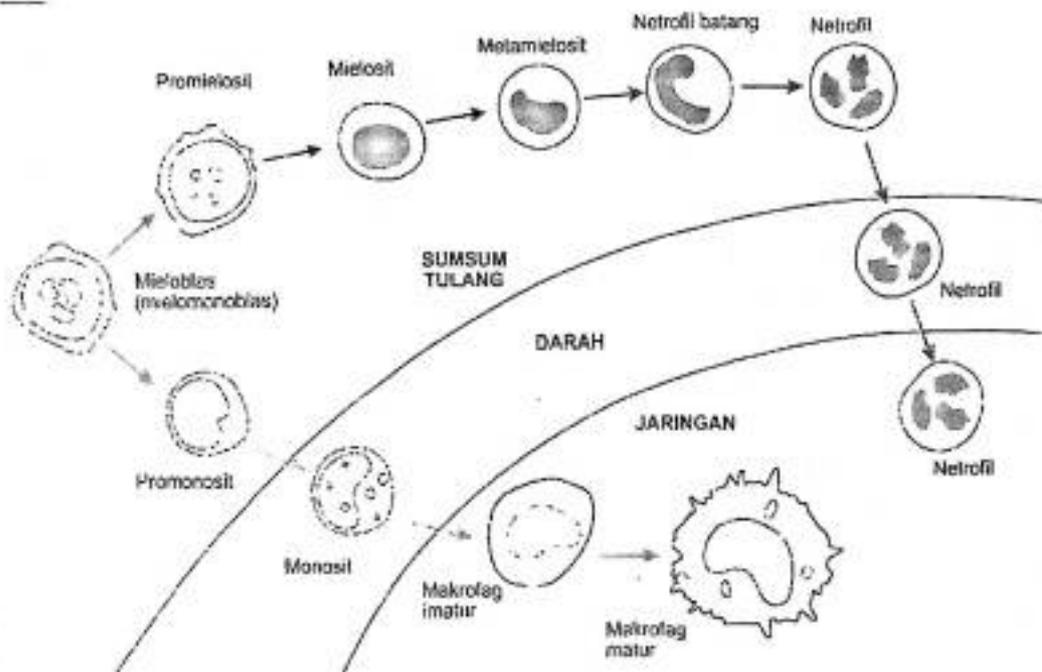
Sel darah matang mempunyai jangka hidup relatif pendek, dan karenanya populasi itu harus secara tetap diganti turunan sel induk yang dihasilkan oleh organ hematopoietik (Yun. *haima*, darah, *poiesis*, pembuatan). Sebelum mencapai kematangan dan sudah dilepas ke dalam sirkulasi, sel-sel darah harus melalui tahap-tahap diferensiasi dan pematangan khusus.

II.4.1.1 Tempat Terjadinya Hematopoiesis

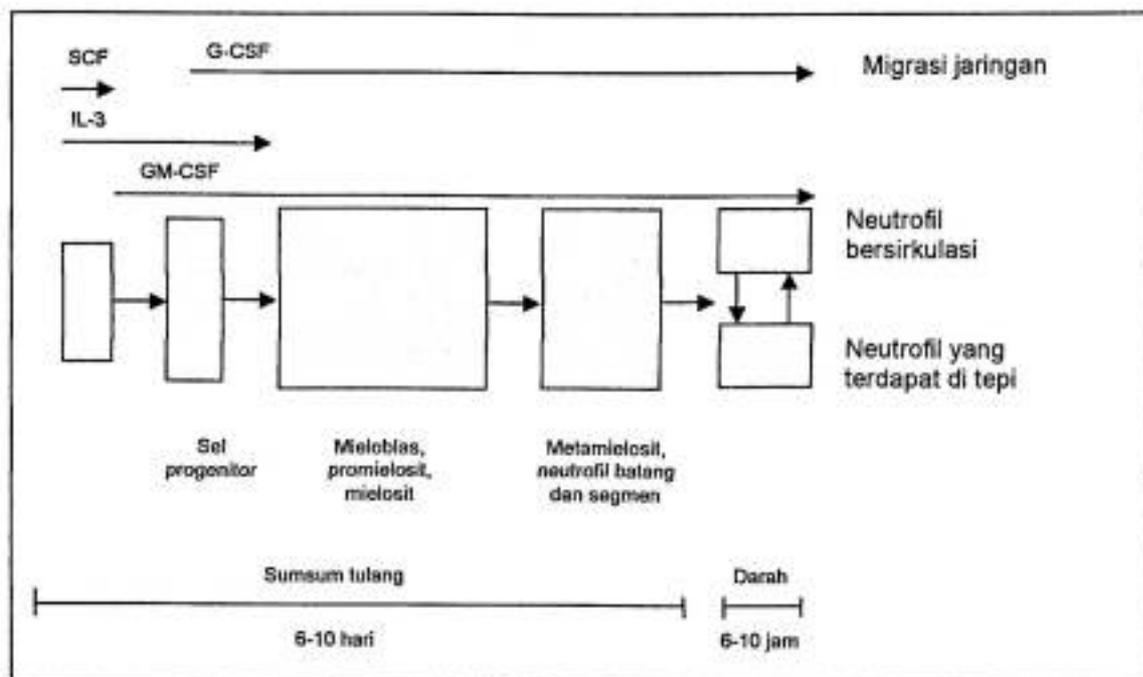
Pada tahap awal embriogenesis, kantung kuning telur (*yolk sac*) adalah tempat utama terjadinya hematopoiesis. Sejak usia 6 minggu sampai bulan ke 6-7 masa janin, hati dan limpa merupakan organ utama yang berperan dan terus memproduksi sel darah sampai sekitar 2 minggu setelah lahir. Sumsum tulang adalah tempat yang paling penting sejak usia 6-7 bulan kehidupan janin dan merupakan satu-satunya sumber darah baru selama masa anak dan dewasa yang normal. Pada masa bayi seluruh sumsum tulang bersifat hematopoietik tetapi selama masa kanak-kanak terjadi penggantian sumsum tulang oleh lemak yang sifatnya progresif di sepanjang tulang panjang sehingga pada masa dewasa, sumsum tulang hematopoietik terbatas pada tulang rangka sentral serta ujung-ujung proksimal os femur dan humerus.



Gambar 1. Gambaran diagram sel induk pluripoten sumsum tulang dan jalur-jalur sel yang berasal darinya.(18)



Gambar 2. Pembentukan fagosit neutrofil dan monosit. Eosinofil dan basofil juga dibentuk dalam sumsum tulang dengan suatu proses yang serupa dengan neutrofil.(18)



Gambar 3. Kinetika pembentukan neutrofil.(18)

II.4.1.2 Sel Induk, Diferensiasi dan Faktor Pertumbuhan

Diduga bahwa semua sel-sel darah berasal dari suatu sel induk tipe tunggal di dalam sumsum tulang. Karena sel-sel ini dapat menghasilkan semua tipe sel darah, maka sel ini disebut sebagai sel induk pluripoten. Sel-sel ini berproliferasi dari satu turunan sel yang akan menjadi limfosit (sel-sel limfoid), dan turunan yang lain akan membentuk sel-sel mieloid yang berkembang di dalam sumsum tulang (granulosit, monosit, eritrosit, dan megakariosit). Kedua sel ini disebut sel induk multipoten.

Sel induk multipoten berproliferasi membentuk anak sel dengan potensial yang berkurang. Sel progenitor uni- atau bipotensial menghasilkan sel prekursor (sel blas) di dalam mana karakteristik morfologi berdiferensiasi untuk pertama kali, mengarahkan kepada tipe sel yang akan dibentuk. Kecepatan mitosis dipercepat dalam sel progenitor dan sel prekursor, menghasilkan sejumlah besar sel-sel yang matang dan

berdiferensiasi dalam sumsum tulang. Sel progenitor dapat menghasilkan sel progenitor yang lain dan sel prekursor, sedangkan sel prekursor hanya dapat menghasilkan sel darah yang matang. Oleh karena itu hematopoiesis merupakan hasil proliferasi dan diferensiasi sel bersamaan, kontinyu yang dihasilkan dari sel induk yang potensialnya telah dikurangi bersamaan dengan laju perkembangannya.

Hematopoiesis tergantung pada adanya kondisi lingkungan mikro yang sesuai dan faktor pertumbuhan. Kondisi lingkungan mikro disediakan oleh sel-sel stroma organ hematopoietik, yang menghasilkan suatu matriks ekstraselular yang penting. Sekali kondisi lingkungan yang dibutuhkan tersedia, perkembangan sel darah bergantung pada faktor yang mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi sel. Zat-zat ini disebut faktor pertumbuhan, faktor perangsang-koloni (*colony stimulating factor/CSF*), atau hematopoietin (poietin). Faktor pertumbuhan hematopoietik adalah hormon glikoprotein yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel-sel progenitor hematopoietik dan fungsi sel-sel darah matur. Faktor-faktor pertumbuhan bekerja terutama dengan merangsang proliferasi (aktivitas mitogenik) dari sel-sel imatur, merangsang diferensiasi dan meningkatkan fungsi sel-sel yang matang.

II.4.1.3 Pematangan Granulosit

Granulosit dan monosit darah dibentuk dalam sumsum tulang dari suatu sel prekursor yang sama. Pada keadaan stabil atau normal, kompartemen penyimpanan sumsum tulang mengandung 10-15 kali dari

jumlah granulosit yang ditemukan dalam sel darah tepi. Setelah pelepasannya dari sumsum tulang, granulosit hanya menghabiskan waktu 6-10 jam dalam darah sebelum pindah ke dalam jaringan tempat mereka melaksanakan fungsi fagositiknya.

Mieloblas adalah sel imatur yang paling dapat dikenali di dalam seri mieloid. Mieloblas memiliki kromatin yang tersebar merata dan nukleoli dapat dilihat. Pada tahap berikutnya, promielosit ditandai oleh sitoplasma basofiliknya dan granula azurofilik. Granula ini mengandung enzim lisosomal dan mieloperoksidase. Promielosit menghasilkan 3 granulosit yang dikenal. Tanda diferensiasi pertama muncul dalam mielosit di mana granula spesifik secara bertahap meningkat dalam jumlah dan akhirnya menempati hampir sebagian besar sitoplasma. Mielosit neutrofilik, basofilik, dan mielosit eosinofilik menjadi matang dengan pepadatan nukleus lebih lanjut dan sangat meningkatkan kandungan granula spesifiknya.

II.4.1.4 Pematangan Limfosit dan Monosit

Pada kehidupan pascanatal, sumsum tulang dan timus merupakan organ limfoid primer tempat berkembangnya limfosit. Pada manusia, limfosit B berasal dari sel induk sumsum tulang. Hingga saat ini masih belum jelas apakah sel tersebut diproses diluar sumsum tulang untuk menjadi limfosit B matur. Pada burung proses ini berlangsung di bursa Fabricius, tetapi pada manusia belum ditemukan organ yang setara. Limfosit T juga awalnya berasal dari sel induk sumsum tulang tetapi

bermigrasi ke timus tempat berdiferensiasi menjadi sel T matur selama perjalanan dari korteks menuju medula. Progenitor sel limfoid pertama adalah yang dapat dikenali ialah limfoblas, sebuah sel yang dapat membelah 2 atau 3 kali menghasilkan prolifosif. Sel terakhir ini lebih kecil dan memiliki relatif lebih banyak kromatin padat.

Monoblas adalah sel progenitor yang dapat dikatakan morfologinya sebenarnya identik dengan mieloblas. Diferensiasi selanjutnya menghasilkan promonosit, sebuah sel besar dengan sitoplasma basofil dan sebuah inti besar, yang sedikit berlekuk. Promonosit membelah 2 kali dalam perjalanan perkembangannya menjadi monosit. Monosit matang masuk peredaran darah, bersirkulasi selama lebih kurang 8 jam, dan kemudian masuk ke jaringan ikat, tempat monosit mengalami pematangan menjadi makrofag dan berfungsi beberapa bulan lamanya.

II.4.2 Jenis-Jenis Leukosit (4,17,18,19)

Leukosit adalah sel yang mengandung inti. Dalam darah manusia normal terdapat jumlah leukosit rata-rata 5000-9000 sel per mm^3 .

Tabel 1. Ukuran dan jumlah leukosit manusia.(19)

Sel	Ukuran	Jumlah
Leukosit		6000 - 1000 μl
Neutrofil	12 - 15 μm	60 - 70 %
Eosinofil	12 - 15 μm	2 - 4 %
Basofil	12 - 15 μm	0 - 1 %
Limfosit	6 - 18 μm	20 - 30 %
Monosit	12 - 20 μm	3 - 8 %

Berdasarkan jenis granula dalam sitoplasma dan bentuk intinya, leukosit dapat digolongkan dalam 2 golongan : *granulosit* (leukosit polimorfonuklear) dan *agranulosit* (leukosit mononuklear).



II.4.2.1 Leukosit Granular

Leukosit granular memiliki 2 jenis granula : (1) granula spesifik yaitu granula yang secara spesifik terikat pada unsur netral atau asam dari campuran pewarna dan memiliki fungsi khusus, dan (2) granula azurofilik yang berwarna ungu dan diperkirakan sebagai lisosim serta mengandung enzim didalamnya. Yang digolongkan dalam granulosit ialah neutrofil, eosinofil, dan basofil.

A



B



C



D



E



Gambar 4. Jenis-jenis leukosit. A = neutrofil; B = eosinofil; C = basofil; D = monosit; E = limfosit.(18)

1. Neutrofil

Sel-sel ini merupakan 60-70 % dari leukosit yang bersirkulasi, garis tengahnya 12-15 μm . Sel ini mempunyai inti padat khas yang terdiri atas 2-5 lobus, dan sitoplasma yang pucat dengan garis batas tidak beraturan mengandung banyak granula merah muda-biru (azurofilik) atau kelabu biru. Granula tersebut dibedakan menjadi granula primer yang tampak pada stadium promielosit, dan sekunder (spesifik) yang tampak pada periode mielosit dan dominan pada neutrofil matur. Jenis granula berasal dari lisosom. Granula primer mengandung mieloperoksidase, fosfatase asam, dan hidrolase asam lainnya, sementara granula sekunder mengandung kolagenase, laktoferin dan lisozim.

Neutrofil adalah sel berumur pendek dengan waktu paruh dalam darah antara 6-7 jam dan jangka hidup antara 1-4 hari. Sebuah sel neutrofil membentuk pertahanan terhadap infasi mikroorganisme, terutama bakteri. Sebuah sel neutrofil dapat

memfagositosis 5-20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati.

2. Eosinofil

Eosinofil adalah sel yang granulanya memiliki afinitas eosin, yang berwarna merah sampai merah jingga. Eosinofil jauh lebih sedikit dari neutrofil dalam darah normal. Sel ini bergaris tengah 12-15 μm dan mengandung inti khas bilobus. Retikulum endoplasma, kompleks Golgi, dan mitokondria belum berkembang. Partikel glikogen relatif banyak. Ciri pengenalan utama ialah adanya banyak sekali granula spesifik besar dan refraktil memanjang (kira-kira 200 per sel). Granula tampak mengandung peroksidase dan sejumlah enzim hidrolitik.

Eosinofil merupakan sel fagosit yang lemah, dan menunjukkan kemotaksis, namun bila dibandingkan dengan neutrofil, maka eosinofil masih diragukan apakah cukup bermakna dalam pertahanan tubuh terhadap tipe infeksi yang cukup. Sebaliknya, eosinofil seringkali diproduksi dalam jumlah besar pada penderita infeksi parasit, dan bermigrasi ke jaringan yang menderita infeksi parasit.

Walaupun kebanyakan parasit terlalu besar untuk dapat difagositosis oleh eosinofil atau sel fagositik lain, namun eosinofil akan melekatkan diri pada parasit melalui molekul permukaan

khusus, dan melepaskan bahan-bahan yang dapat membunuh banyak parasit.

Eosinofil juga mempunyai kecenderungan khusus untuk berkumpul dalam jaringan yang mengalami reaksi alergi, misalnya dalam jaringan prebronkial paru penderita asma dan dalam kulit setelah mengalami reaksi alergi. Sedikitnya, hal ini sebagian disebabkan oleh peristiwa dimana sel mast dan basofil ikut serta berperan dalam reaksi alergi; sel mast dan basofil ini melepaskan faktor kemotaktik eosinofil yang menyebabkan eosinofil bermigrasi ke arah jaringan alergik yang meradang. Eosinofil diduga mendetoksifikasi beberapa substansi pencetus peradangan yang dilepaskan oleh sel mast dan basofil, dan barangkali juga memfagositosis dan menghancurkan kompleks antibodi-alergen, jadi mencegah proses peradangan setempat.

3. Basofil

Kurang dari 1 % leukosit darah adalah basofil dan oleh karena itu sukar di temukan dalam pemulasan darah normal. Basofil bergaris tengah 12-15 μm dan mempunyai inti yang kurang heterokromatik daripada granulosit lain. Intinya terbagi dalam lobus tidak teratur, namun seringkali terhalangi granula-granula spesifik di atasnya. Granula spesifik basofil mengandung heparin dan histamin dan sanggup melepaskan leukotrien, yang menyebabkan kontraksi lambat pada otot polos. Basofil dapat melengkapi fungsi sel mast

pada reaksi hipersensitif yang cepat dengan bermigrasi (dalam keadaan khusus) ke dalam jaringan ikat.

Terdapat beberapa persamaan dan perbedaan antara granula dari basofil dan sel mast. Keduanya metakromatik dan mengandung heparin dan histamin. Sebagai reaksi terhadap antigen tertentu, basofil dapat melepaskan isi granulanya seperti halnya pada sel mast. Meskipun banyak persamaannya, sel mast dan basofil tidak sama, bahkan pada spesies yang sama pun mereka memiliki penampilan ultrastruktur berbeda dan berasal dari sel induk yang berbeda dalam sumsum tulang.

II.4.2.2 Leukosit Agranular

Leukosit agranular mempunyai sitoplasma yang tampak homogen, dan intinya berbentuk bulat atau ginjal.

1. Monosit

Agranulosit yang berasal dari sumsum tulang ini bergaris tengah antara 12-20 μm . Intinya lonjong, berbentuk tapal kuda, atau berbentuk ginjal dan umumnya terletak eksentris. Kromatinnya kurang padat dan tersusun lebih fibrilar daripada dalam limfosit. Karena penyebaran kromatin yang baik ini, inti monosit berwarna lebih pucat daripada inti limfosit besar.

Sitoplasma monosit bersifat basofilik dan seringkali mengandung granula azurofilik yang sangat halus. Granula-granula tersebut adalah lisosom. Pada mikroskop elektron, 1 atau 2 anak

inti tampak dalam inti, dan terlihat sedikit retikulum endoplasma kasar, poliribosom, dan banyak mitokondria kecil. Kompleks Golgi yang berperan dalam pembentukan granula lisosom terdapat dalam sitoplasma. Banyak mikrovili dan vesikel pinositotik terdapat dalam permukaan sel (19).

Monosit hanya sebentar berada dalam sumsum tulang dan setelah bersirkulasi selama 20-40 jam, meninggalkan darah dan memasuki jaringan untuk menjadi matur dan melaksanakan fungsi utamanya. Lama hidup ekstravaskular setelah berubah menjadi makrofag dapat selama beberapa bulan atau bahkan beberapa tahun. Monosit menjalankan fungsi spesifik dalam jaringan yang berbeda, misalnya kulit, usus, hati dan lain sebagainya (18). Dalam jaringan tersebut monosit berinteraksi dengan limfosit (sel T) dan berperan penting dalam pengenalan dan interaksi dari sel imunokompeten dan antigen (19).

2. Limfosit

Limfosit adalah sel yang kompeten secara imunologik dan membantu fagosit dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi dan invasi asing lain (18).

Walaupun kebanyakan limfosit dalam jaringan limfoid normal tampak serupa di bawah mikroskop, tapi sel-sel tersebut secara jelas dapat dibedakan dalam 2 kelompok besar. Satu kelompok, yaitu limfosit T, bertanggung jawab dalam pembentukan limfosit

teraktivasi yang dapat membentuk imunitas diperantarai sel, dan kelompok lain yaitu limfosit B, bertanggung jawab dalam pembentukan antibodi yang memberikan imunitas humoral (16).

Pembagian fundamental limfosit dalam 2 golongan dapat dilakukan berdasarkan tempat diferensiasi limfosit dan adanya protein membran integral tersendiri. Diferensiasi menjadi sel imunokompeten terjadi dalam sumsum tulang dan dalam timus (19).

a. Limfosit T

Sel T juga awalnya berasal dari sel induk sumsum tulang tetapi bermigrasi ke timus tempat berdiferensiasi menjadi sel T matur selama perjalanan dari korteks menuju medula. Selama proses ini ini, sel T yang swareaktif (*self-reaktif*) dibuang (seleksi negatif) sedangkan sel T yang memiliki sedikit spesifitas terhadap molekul antigen leukosit manusia pejamu diseleksi (seleksi positif) (7).

Sel T umumnya berperan pada inflamasi, aktivasi makrofag dalam fagositosis, aktivasi dan proliferasi sel B dalam produksi antibodi. Sel T juga berperan dalam pengenalan dan penghancuran sel yang terinfeksi virus (7).

Sel T terdiri dari (7) :

- Sel T naif (*virgin*)

Sel Limfosit naif adalah limfosit matang, belum berdiferensiasi, belum pernah terpajan dengan antigen dan menunjukkan molekul permukaan CD45RA. Sel ditemukan dalam organ limfoid primer. Sel naif yang terpajan dengan antigen akan berkembang menjadi sel T *helper* 0 (sel Th0) yang selanjutnya dapat berkembang menjadi sel efektor Th1 dan Th2 yang dapat dibedakan atas dasar sitokin-sitokin yang diproduksinya. Sel Th0 memproduksi sitokin dari kedua jenis sel tersebut seperti Interleukin 2 (IL-2), Interferon (IFN) dan IL-4.

- Sel CD4⁺

Sel T matang yang meninggalkan timus namun belum terpajan dengan antigen disebut sel T naif. Sel tersebut dapat masuk sirkulasi, masuk dan menetap di dalam organ limfoid seperti kelenjar getah bening untuk bertahun-tahun sebelum terpajan dengan antigen atau mati.

Sel T naif CD4⁺ mengenal antigen yang dipresentasikan bersama *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC-II) dan berkembang menjadi subset sel Th1 atau sel T *delayed type hypersensitivity* (sel Tdth) atau Th2 yang tergantung dari sitokin lingkungan.

IFN- γ dan IL-12 yang diproduksi *Antigen Presenting Cell* (APC) seperti makrofag dan sel dendritik yang diaktifkan

mikroba merangsang diferensiasi sel $CD4^+$ menjadi $Th1/Tdth$ yang berperan dalam reaksi hipersensitivitas lambat (reaksi tipe 4 Gell dan Coombs). Sel $Tdth$ berperan untuk mengerahkan makrofag dan sel inflamasi lainnya ke tempat terjadinya reaksi hipersensitivitas tipe lambat.

Atas pengaruh sitokin IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 yang dilepas sel mast yang terpajan dengan antigen atau cacing, sel $Th0$ berkembang menjadi sel $Th2$ yang merangsang sel B untuk meningkatkan produksi antibodi. Kebanyakan sel Th adalah $CD4^+$ yang mengenal antigen yang dipresentasikan di permukaan sel APC yang berhubungan dengan molekul MHC-II.

- Sel $T \alpha\beta$ dan $T \gamma\delta$

Ada 2 jalur diferensiasi sel T yang dapat dibedakan dari ekspresi reseptor sel T yang berlainan yaitu $\gamma\delta$ yang merupakan populasi minor yang terutama ditemukan di kulit dan mukosa jaringan saluran cerna. Sel T terbanyak mengekspresikan reseptor $\alpha\beta$. Sel $T \gamma\delta$ berperan dalam pertahanan terdepan untuk mengenal mikroba yang masuk kulit dan mukosa saluran cerna. Sel tersebut melepas sitokin yang mengawali respon inflamasi, menolong sel B, mengaktifkan makrofag dan menghancurkan sel sel terinfeksi virus. Fungsional hal itu sama dengan sel $T \alpha\beta$.

Perbedaan yang mencolok, sel T $\gamma\delta$ dapat mengenal antigen nonpeptida fosfolipid dinding bakteri tanpa memerlukan presentasi dan proses terlebih dahulu oleh APC.

- Sel T CD8⁺ (*Cytotoxic T Lymphocyte/CTL/ T cytotoxic/ T cytolytic/ Tc*)

Sel T CD8⁺ mengenal antigen yang dipresentasikan bersama molekul *Major Histocompatibility Complex class I* (MHC-I). Molekul MHC-I ditemukan pada semua tubuh yang bernukleus. Fungsi utamanya ialah menyingkirkan sel yang terinfeksi virus dengan menghancurkan sel tersebut. Sel CTL/Tc akan juga menghancurkan sel ganas dan sel histoinkompatibel yang menimbulkan penolakan pada transplantasi. Dalam keadaan tertentu sel CTL/Tc dapat juga menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri intraselular.

- Sel T supresor (sel Ts) atau sel T regulator (sel Tr)

Sel T supresor (sel Ts) yang juga disebut Sel T regulator (sel Tr) berperan menekan aktivitas sel efektor T yang lain dan sel B. Menurut fungsinya, sel Ts dapat dibagi menjadi sel Ts spesifik untuk antigen tertentu dan sel Ts nonspesifik. Tidak ada petanda unik pada sel ini, tetapi penelitian menemukan adanya petanda molekul CD8⁺. Molekul CD4⁺ kadang dapat pula supresif.

Kerja sel T regulator diduga dapat mencegah respon sel Th1. sel T regulator dapat mencegah aktivasi sel T melalui mekanisme yang belum jelas (kontak yang diperlukan antara sel regulator dan sel T atau APC). Beberapa sel T regulator melepas sitokin immunosupresif seperti IL-10 yang mencegah fungsi APC dan aktivasi makrofag dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang mencegah proliferasi sel T dan aktivasi makrofag.

b. Limfosit B

Limfosit B dinamai menurut organ khusus yang ditemukan pada burung yang dinamai bursa *Fabricius*. Pada pada manusia, sel B berasal dari sel induk sumsum tulang. Hingga saat ini masih belum jelas apakah sel tersebut diproses di luar sumsum tulang untk menjadi limfosit matur. Pada burung proses ini dberlangsung pada bursa Fabricius tetapi pada manusia tidak ditemukan organ yang setara (18,20).

Aktivasi sel B diawali dengan pengenalan spesifik oleh reseptor permukaan. Antigen dan perangsang lain termasuk Th merangsang proliferasi dan diferensiasi klon sel B spesifik. Dalam perkembangannya, sel B mula-mula memproduksi imunoglobulin M (IgM) atau isotip Ig lainnya (seperti IgG, IgE, IgA dan IgD), menjadi matang atau menetap sebagai sel memori (7).

Antibodi (imunoglobulin) bekerja terutama melalui 2 cara untuk mempertahankan tubuh terhadap agen penyakit yaitu dengan langsung menyerang penyebab penyakit tersebut dan dengan mengaktifkan sistem komplemen yang kemudian dengan berbagai cara yang dimilikinya akan merusak penyebab penyakit tersebut (16).

Akibat sifat bivalen dari antibodi dan banyak tempat antigen pada sebagian besar agen penyebab penyakit, maka antibodi dapat mematikan aktivitas agen penyebab penyakit tersebut dengan salah satu cara sebagai berikut (16) :

- Aglutinasi, di mana berbagai partikel besar dengan antigen pada permukaannya, seperti bakteri atau sel darah merah, terikat bersama-sama menjadi satu kelompok.
- Presipitasi, di mana kompleks molekular dari antigen yang larut dan antibodi menjadi begitu besar sehingga berubah menjadi tak larut dan membentuk presipitasi.
- Netralisasi, di mana antibodi menutupi tempat-tempat yang toksik dari agen yang bersifat antigenik.
- Lisis, di mana beberapa antibodi yang sangat kuat kadang-kadang mampu langsung menyerang membran sel agen penyebab penyakit sehingga menyebabkan sel tersebut robek.

c. *Sel Natural Killer (Sel NK)*

Limfosit terdiri atas sel B, sel T (Th dan CTL) dan sel *Natural Killer* (sel NK). Yang terakhir adalah golongan limfosit ketiga sesudah sel T dan sel B. Jumlahnya sekitar 5-15 % dari limfosit dalam sirkulasi dan 45 % dari limfosit dalam jaringan. Sel tersebut berfungsi dalam imunitas nonspesifik terhadap virus dan sel tumor. Secara morfologis, Sel NK merupakan limfosit dengan granul besar (*Large Granular Lymphocyte/ LGL*). Ciri-cirinya yaitu memiliki banyak sekali sitoplasma (limfosit T dan B hanya sedikit mengandung sitoplasma), granul sitoplasma azurofilik, pseudipodia dan nukleus eksentris (7).

Sel NK merupakan golongan limfosit, tetapi tidak mengandung petanda seperti yang ditemukan pada permukaan sel B dan sel T. Oleh karena itu disebut sel N0 (0) atau sel populasi ketiga atau nonTnonB (7).

Sel NK mengandung perforin atau sitolisin, sejenis C9 yang dapat membuat lubang-lubang kecil (perforasi) pada membran sel sasaran. Perforin/ sitolisin dilepas setelah terjadi kontak. Hal itu menimbulkan influks ion abnormal dan kebocoran metabolit esensial dari sitoplasma. Sel-sel NK juga mengandung granul-granul berisikan TNF- β dan protease serin yang disebut *granzyme*, contohnya fragmentin yang merupakan protein sitotoksik yang dilepas bila terjadi degranulasi sel NK.

Sitotoksisitas serupa diekspresikan oleh sel CTL/Tc yang juga mengandung porfirin (7).

Membran sel NK mengandung protein (prolaktin) yang mengikat perforin, mencegah insersi dan polimerasi dalam membran sehingga sel NK sendiri terhindar dari efek perforin. Selain itu sel NK memiliki reseptor untuk bagian konstan dari antibodi seperti halnya dengan fagosit. Kompleks yang terjadi antara antibodi dengan reseptornya di permukaan sel tersebut akan mengaktifkan sel NK sehingga mampu membunuh sel terinfeksi virus, jamur dan tumor dengan langsung tanpa bantuan komplemen. Fenomena ini disebut *Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity* atau *Antibody Dependent Cell Cytotoxicity* (ADCC). Sel NK juga melepas IFN- γ yang mencegah penyebaran virus dari sel terinfeksi. Di samping sel NK, makrofag dan neutrofil juga berperan pada ADCC (7).

Sel NK berperan pada imunitas nonspesifik, tidak memerlukan pajanan dan pengenalan mikroba melalui molekul MHC. Sel NK secara alamiah sudah merupakan limfosit sitotoksik yang ditemukan sejak lahir dan berperan pada sistem imun nonspesifik selular. Jumlah dan aktivitasnya dapat ditingkatkan oleh sistem imun spesifik antara lain atas pengaruh IL-2 dan IFN (7).

II.5 Immunologi Kanker (1,5,6,7)

Sel kanker dikenal oleh tubuh sebagai bahan asing, sehingga mekanisme imunologi tubuh akan beraksi secara humoral maupun seluler. Tubuh mempunyai kemampuan untuk *surveillance* imunitas (*immunosurveillance*) terhadap semua sel kanker maupun sel yang bermutasi untuk mencegah perkembangan sel kanker tersebut, namun terkadang terjadi *immunological escape* yaitu sel kanker luput dari pengawasan sistem imun, sehingga terjadilah kanker. Penderita kanker sendiri juga mengalami supresi imun tetapi kanker juga mempengaruhi sistem imun itu sendiri.

II.5.1 Respon Sistem Imun Terhadap Sel Kanker

Sel kanker dikenal sebagai *nonself* yang bersifat antigenik pada sistem imunitas sehingga akan menimbulkan respon imun secara selular maupun humoral.

II.5.1.1 Imunitas Humoral Terhadap Kanker

Imunitas humoral lebih sedikit berperan daripada imunitas seluler dalam proses penghancuran kanker, tetapi tubuh tetap membentuk antibodi terhadap sel kanker. Dua mekanisme antibodi diketahui dapat menghancurkan sel kanker yaitu :

1. *Antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC)*

Pada ADCC antibodi Immunoglobulin G (IgG) spesifik berikatan terhadap *Tumor Associated Antigen (TAA)* dan sel efektor untuk bagian Fc dari molekul Ig. Antibodi bertindak sebagai

jembatan antara efektor dan target. Antibodi yang terikat dapat merangsang pelepasan superoksida atau peroksida dari sel efektor. Sel yang dapat bertindak sebagai efektor disini adalah limfosit null (sel K), monosit, makrofag, leukosit polimorfonuklear, dan fragmen trombosit dan akan mengalami lisis optimal dalam 4-6 jam.

2. *Complement dependent cytotoxicity*

Pengikatan antibodi ke permukaan sel tumor menyebabkan rangkaian peristiwa komplemen klasik dari C 1,4,2,3,5,6,7,8,9. Komplemen C akhir menciptakan saluran atau kebocoran pada permukaan sel tumor. Immunoglobulin M (IgM) lebih efisien dibanding IgG dalam merangsang proses *complement dependent cytotoxicity*.

II.5.1. Imunitas Seluler Terhadap Kanker

Pada pemeriksaan patologi-anatomi tumor, seringkali ditemukan infiltrat sel-sel yang terdiri atas sel fagosit mononuklear, limfosit, sedikit sel plasma dan sel mastosit. Sistem imun yang nonspesifik dapat langsung menghancurkan sel tumor tanpa sensitasi sebelumnya. Efektor sistem imun tersebut adalah sel Tc, fagosit mononuklear, polimorfonuklear, dan sel NK. Aktivasi sel T melibatkan sel Th dan sel Tc. Sel Th penting dalam pengerahan dan aktivasi makrofag dan sel NK.

1. Sitotoksitas melalui sel T

Kontak langsung antara sel target dan limfosit T menyebabkan interaksi antara reseptor spesifik pada permukaan sel T dengan antigen membran sel target yang mencetuskan

induksi kerusakan membran yang bersifat letal. Mekanisme penghancuran sel tumor yang pasti belum diketahui walaupun pengrusakan membran sel target dengan hilangnya integritas osmotik merupakan peristiwa akhir. Pelepasan limfotoksin (LT), interaksi membran-membran langsung dan aktifitas *T cell associated enzyme* seperti fosfolipase diperkirakan merupakan penyebab rusaknya membran.

Interleukin (IL), interferon (IFN) dan sel T mengaktifkan pula sel NK. Sel ini berbentuk *Large Granulocytic Lymphocyte* (LGL). Kebanyakan sel ini mengandung reseptor Fc dan banyak yang mengekspresikan antigen sel T. Lisis sel target dapat terjadi tanpa paparan pendahuluan dan target dapat dibunuh langsung. Sel NK menunjukkan beberapa spesifitas yang lebih luas terhadap target tumor yang biasanya dibunuh lebih cepat dibandingkan sel normal. Kematian sel tumor dapat sebagai akibat paparan terhadap toksin yang terdapat dalam granula LGL, produksi superoksida atau aktivitas protease serine pada permukaan sel efektor. Secara *in vitro* sel NK dapat diaktivasi oleh IFN dan IL-2.

2. Sitotoksitas melalui makrofag

Makrofag yang teraktivasi berikatan dengan sel neoplastik lebih cepat dibanding sel normal. Pengikatan khusus makrofag yang teraktivasi ke membran sel tumor adalah melalui struktur yang sensitif terhadap tripsin. Pengikatan akan bertambah kuat dan erat

dalam 1 sampai 3 jam dan ikatan ini akan mematikan sel. Sekali pengikatan terjadi, mekanisme sitotoksitas melalui makrofag berlanjut dengan transfer enzim lisosim, superoksida, protease, faktor sitotoksik yang resisten terhadap inhibitor protease dan yang menyerupai limfotoksin.

Makrofag bila diaktifkan oleh limfokin, endotoksin, RNA dan IFN akan menunjukkan aktivasi berupa adanya perubahan morfologik, biokimiawi dan fungsi sel. Makrofag yang diaktifkan biasanya menjadi sitotoksik nonspesifik terhadap sel tumor *in vitro*. Makrofag dapat pula berfungsi sebagai efektor pada ADCC terhadap tumor.

II.5.2 Surveillance Imunitas

Surveillance imunitas (*immunosurveillance*) adalah suatu mekanisme yang digunakan tubuh untuk bereaksi melawan setiap antigen yang diekspresikan oleh neoplasma.

Fungsi primer dari sistem imun adalah untuk mengenal dan mendegradasi antigen asing yang timbul dalam tubuh. Dalam surveillance imun, sel mutan akan dianggap mengekspresikan satu atau lebih antigen yang dapat dikenal sebagai *nonself*. Sel mutan dianggap sering timbul dalam tubuh manusia dan tetapi secara cepat dihancurkan oleh mekanisme imunologis. Pada tikus yang kehilangan imunitas seluler dan terpapar agen onkogenik akan lebih cepat timbul tumor. Pemakaian obat immunosupresif setelah transplantasi ginjal mengalami peningkatan insiden

keganasan (100 kali lebih besar dari kontrol). Ini dianggap merupakan bukti mekanisme surveillance imunitas.

Sistem imunitas tubuh secara terus menerus mengadakan surveillance imun dan menghancurkan sel-sel tubuh yang mengalami transformasi ganas. Timbulnya kanker dapat dianggap karena adanya kegagalan sistem imun melakukan surveillance.

Sel NK ternyata paling berperan dalam surveillance imunitas tumor, dapat membunuh sel tumor tanpa perlu disensitasi terlebih dahulu. Dalam surveillance imunitas dianggap ada keadaan immunosupresi yang menyertai keadaan tumbuhnya tumor, terutama depresi sel NK.

II.5.3 Immunological Escape

Walaupun ada sistem surveillance imunitas, kanker dapat luput dari pengawasan sistem imun tubuh bila faktor-faktor yang menunjang pertumbuhan tumor lebih berpengaruh dibanding dengan faktor-faktor yang menekan tumor.

Mekanisme luputnya tumor dari pengawasan sistem imun tubuh adalah sebagai berikut :

1. Ekspresi *Major Histocompatibility Complex class I* (MHC-I) menurun pada sel tumor, sehingga tidak dikenali oleh sel Tc.
2. Tumor kehilangan ekspresi antigen yang mengaktifkan sistem imun
3. Tumor gagal menginduksi sel Tc, karena kebanyakan tumor tidak mengekspresikan kostimulator atau *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC-II).

4. Produk dari sel tumor dapat menekan respon imun, misalnya tumor memproduksi *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) yang menghambat proliferasi dan fungsi efektor limfosit dan makrofag.
5. Antigen tumor menginduksi toleransi imunologi.
6. Permukaan antigen tumor ditutupi oleh molekul glikokaliks seperti mukopolisakarida yang mengandung asam sialat.

II.6 Hitung Leukosit Total

Seringkali banyak yang dapat diketahui tentang keadaan kesehatan seorang penderita dengan mempelajari secara saksama sajian darah tepinya. Pertama penyakit tertentu disertai adanya sel darah abnormal. Kedua, penentuan proporsi relatif jenis-jenis leukosit berbeda (yang disebut hitung jenis leukosit) memberi keterangan yang dapat membantu diagnosis. Namun untuk sampai pada diagnosis, sama pentingnya untuk mengetahui apakah jumlah total leukosit itu normal (disebut hitung leukosit total) (21).

Terdapat 2 cara untuk menghitung leukosit dalam darah tepi. Yang pertama adalah cara manual dengan memakai pipet leukosit, kamar hitung dan mikroskop. Cara kedua adalah cara semi otomatis dengan memakai alat elektronik. Cara kedua ini lebih unggul dari cara pertama karena tekniknya lebih mudah dan waktu yang diperlukan lebih singkat. Keburukan dari alat tersebut adalah harganya yang mahal dan mengharuskan pemakaian dan pemeliharaan yang sangat cermat. Untuk itu cara-cara menghitung sel darah secara manual dengan memakai pipet

dan kamar hitung tetap menjadi upaya penting dalam laboratorium klinik (22,23).

Darah diencerkan dalam pipet leukosit, kemudian dimasukkan ke dalam kamar hitung. Jumlah leukosit dihitung dalam volume tertentu, dengan mengenakan faktor konversi jumlah leukosit per mikroliter darah dapat diperhitungkan. Larutan pengencer ialah larutan Turk yang mempunyai susunan larutan gentian violet 1% dalam air 1 ml, asam asetat glasial 1 ml dan air suling sampai 100 ml. Penambahan gentian violet bertujuan memberi warna pada inti dan granula leukosit. Larutan ini memecah eritrosit dan trombosit tetapi tidak leukosit (23,24).

1. Alat dan Bahan yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah gelas ukur (500 ml), botol suling (Improved Neubauer), mikroskop tabung makro (Mikroskopik), Sartorius, timbangan gram, timbangan hewan, spektrofotometer, kromatograf cair vakum, labu tentukur 100 ml (Drex), inkubator (Epporex), oven listrik (Memmert), magnetic stirer, alat sentrifus (Hettich), pelana maserasi, bejana kromatografi, lampu UV 254 dan 366 nm.

Bahan-bahan yang digunakan adalah Askamex® (levamisol), daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill), air suling, Natrium CMC, metanol, etil asetat, n-heksan, kloroform, H₂SO₄ 10%, larutan Turk, lempang KLT Silika Gel F 254 (E. Merck) dan Silika Gel 60 PF 254 (E. Merck).

1.2 Penyiapan Sampel Penelitian

1.2.1 Penyiapan Sampel

Sampel daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) diambil dari Desa Larijoko, kecamatan Parangloe, kabupaten Gowa yang telah diidentifikasi oleh Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian, Bogor. Sampel daun Parrang Romang diambil pada pagi hari, sampel yang terkumpul dibersihkan lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan jauh dari sinar matahari langsung. Kemudian

sampel yang telah kering diserbukan dan siap digunakan sebagai bahan penelitian.

III.2.2 Ekstraksi Sampel

Sebanyak 500 gram daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) yang telah diserbukan, dimasukkan ke dalam bejana maserasi. Kemudian ditambahkan pelarut metanol secukupnya dan diremas-remas, didiamkan selama 12 jam, dan ditambahkan pelarut metanol sampai seluruh sampel terendam sempurna. Bejana maserasi ditutup rapat, disimpan dalam tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung. Filtrat disaring, ampasnya diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak cair yang diperoleh dikisatkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak kental dan ditimbang.

III.2.3 Partisi Pelarut

Partisi sampel dilakukan dengan metode partisi cair padat. Sebanyak 30 gram ekstrak metanol kental ditambahkan n-heksan sebanyak 100 ml dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Kemudian disentrifuge sehingga terpisah antara ekstrak n-heksan sebagai supernatan dan bagian yang tidak larut sebagai endapan. Pengerjaan dilakukan berulang sehingga proses partisi sempurna. Untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik, ekstrak n-heksan dan endapan dimonitor profil komponen kimianya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis.

III.2.4 Isolasi dengan Kolom Kromatografi Cair Vakum

III.2.4.1 Penyiapan Kolom Kromatografi Cair Vakum

Kolom Kromatografi Cair Vakum dan labu penampung terlebih dahulu dibilas dengan kloroform-metanol (1:1), selanjutnya kolom dipasang di atas labu penampung dan dalam kolom dimasukkan fase diam (silika gel 60 PF 254) dan dihubungkan dengan pompa vakum hingga silika gel mampat. Eluen yang paling pertama digunakan yaitu eluen yang paling non polar dimasukkan dalam kolom untuk membantu pemampatan fase diam.

III.2.4.2 Penyiapan Sampel Kolom Kromatografi Cair Vakum

Sebanyak 2 gram ekstrak n-heksan yang diperoleh dari hasil partisi ekstrak kental metanol kemudian ditambahkan silika gel 60 PF 254 sedikit demi sedikit sambil diaduk merata hingga kering, campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan diletakan kertas saring di atas sampel.

III.2.4.3 Fraksinasi Komponen Kimia

Ekstrak n-heksan yang diperoleh dari hasil partisi ekstrak kental metanol selanjutnya di KLT dan diamati profil KLT-nya untuk menentukan fase gerak yang akan digunakan pada kromatografi cair vakum. Berdasarkan profil KLT tersebut ekstrak n-heksan difraksinasi lebih lanjut menggunakan kromatografi cair vakum dengan fase diam silika gel dan fase gerak heksan, heksan : etil asetat (25:1; 20:1; 15:1; 10:1; 10:1; 5:1; 5:1; 1:1); etil asetat, etil asetat : metanol (1:1; 1:5); dan metanol (2 kali).

Fraksi-fraksi yang diperoleh diupayakan kemudian dimonitor profil KLT-nya menggunakan fase gerak heksan : etil asetat (6:1) serta divisualisasi dengan sinar UV 254 nm, 366 nm, dan H₂SO₄ 10%. Fraksi dengan profil KLT yang sama digabung.

III.3 Pembuatan Sediaan-Sediaan Uji

III.3.1 Pembuatan Larutan Koloidal Natrium CMC 1%.

Sebanyak 1 gram Natrium CMC dimasukan sedikit demi sedikit ke dalam air suling panas (suhu 70° C) sambil diaduk dengan pengaduk elektrik hingga terbentuk larutan koloidal dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml dengan air suling.

III.3.2 Pembuatan Suspensi Levamisol

Sebanyak 20 tablet Askamex[®] (levamisol) ditimbang dan dihitung bobot rata-rata 1 tablet lalu digerus hingga menjadi serbuk. Sejumlah serbuk yang setara dengan 68,25 mg levamisol ditimbang dan dimasukan dalam lumpang, ditambahkan larutan koloidal Natrium CMC 1% sedikit demi sedikit dan digerus sampai homogen. Suspensi dimasukan dalam labu tentukur 100 ml dan dicukupkan volumenya. (Perhitungan konversi dosis dan pembuatan suspensi levamisol dapat dilihat pada lampiran IV)

III.3.3 Pembuatan Suspensi Fraksi

Empat belas fraksi hasil Kolom Kromatografi Cair Vakum yang telah digabung menjadi 5 fraksi berdasarkan kesamaan profil KLTnya, dibuat suspensi dengan menggunakan larutan koloidal Natrium CMC 1% sebagai pembawa. Konsentrasi yang disiapkan untuk masing-masing fraksi

disesuaikan dengan perhitungan dosis yaitu 8 µg/g BB mencit; 16 µg/g BB mencit; 50 µg/g BB mencit dan 100 µg/g BB mencit. Untuk dosis 8 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,024 %b/v dibuat dengan menimbang fraksi sebanyak 24 mg kemudian digerus dalam lumpang sambil ditambahkan sedikit demi sedikit larutan koloidal Natrium CMC 1% sampai terbentuk suspensi yang homogen, dimasukkan dalam labu tentukur 100 ml dan dicukupkan volumenya. Untuk dosis 16 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,048 %b/v, dosis 50 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,15 %b/v dan dosis 100 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,3 %b/v digunakan cara yang sama dengan menimbang fraksi masing-masing 48 mg, 150 mg dan 300 mg. (Perhitungan dosis dan pembuatan suspensi fraksi etil asetat dapat dilihat pada lampiran V)

III.4 Pelaksanaan Uji Efek Peningkatan Aktivitas Leukosit Mencit

III.4.1 Penyiapan dan Pemilihan Hewan Uji

III.4.1.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus*) yang sudah dewasa, sehat dan aktivitas normal dengan bobot badan antara 25 – 30 gram. Hewan-hewan tersebut diadaptasikan dengan lingkungan sekitarnya selama 1-2 minggu. Mencit jantan disiapkan sebanyak 66 ekor yang dibagi dalam 22 kelompok masing-masing terdiri dari 3 ekor. Kelompok I adalah kelompok kontrol positif yang diberi suspensi levamisol, kelompok II adalah kelompok kontrol negatif yang diberi larutan koloidal Na CMC 1% dan kelompok III sampai dengan

kelompok XXII adalah kelompok perlakuan yang masing-masing diberi suspensi fraksi 1, 2, 3, 4 dan 5 dengan dosis 8 µg/g BB mencit; 16 µg/g BB mencit; 50 µg/g BB mencit dan 100 µg/g BB mencit.

III.4.1.2 Pemilihan Hewan Uji

Hewan uji mencit jantan diseleksi dengan memilih mencit jantan yang memiliki jumlah leukosit total yang normal pada rentang bawah.

III.4.2 Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Hewan uji yang telah diukur kadar leukosit awal dan diseleksi diberikan suspensi fraksi, suspensi levamisol sebagai kontrol positif, dan larutan koloidal Natrium CMC 1% sebagai kontrol negatif selama 12 hari secara oral. Setelah 4 hari, diambil darah mencit dari vena ekor dengan memotong ekor sedikit kemudian dihitung jumlah leukosit. Hal yang sama dilakukan pada hari ke-8 dan hari ke-12.

III.5 Perhitungan Jumlah Leukosit Total (23,24)

Sebanyak 0,38 ml larutan Turk dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 20 µl darah, dan campur hingga homogen. Kemudian dimasukkan ke dalam kamar hitung dan dibiarkan selama 2–3 menit dan dihitung dibawah mikroskop.

Jumlah leukosit yang dihitung sama dengan jumlah leukosit per volume darah yang dihitung (µl) dikalikan faktor pengenceran. Bila jumlah leukosit dalam ke 4 bidang besar adalah N, maka :

$$\text{Jumlah leukosit} = \frac{N}{0,4} \times 20 / \mu\text{l darah}$$



III.6 Pengumpulan dan Analisis Data

Data dikumpulkan dari hasil perhitungan jumlah leukosit total dan selanjutnya dianalisa secara statistik dengan metode Rancangan Faktorial.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Pengamatan

Maserasi 500 g daun parrang romang menghasilkan 60 g ekstrak metanol kental sebagai ekstrak awal dengan nilai rendamen sebesar 12 % (perhitungan rendamen dapat dilihat pada lampiran VI). Sebanyak 30 g ekstrak metanol kental dipartisi dengan pelarut n-Heksan dan diperoleh ekstrak n-Heksan dan bagian tidak larut n-Heksan. Fraksinasi ekstrak n-Heksan menghasilkan lima fraksi yaitu fraksi 1, 2, 3, 4, dan 5 (gambar 5)

Rata-rata hasil perhitungan jumlah leukosit total masing-masing fraksi sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2. Rata-rata jumlah leukosit total/ μ l darah setiap pemberian fraksi parrang romang.

Perlakuan	Jumlah Leukosit Rata-rata/ μ l Darah			
	Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Kontrol Positif	6.867	10.867	8.800	7.600
Kontrol Negatif	6.400	6.500	6.950	7.350
Fraksi 1, dosis 100 μ g/g BB	10.900	14.733	10.600	8.400
Fraksi 1, dosis 50 μ g/g BB	9.200	12.200	8.967	7.867
Fraksi 1, dosis 16 μ g/g BB	5.833	9.467	8.667	6.717
Fraksi 1, dosis 8 μ g/g BB	9.667	12.667	10.867	9.133
Fraksi 2, dosis 100 μ g/g BB	11.733	14.467	11.200	8.867
Fraksi 2, dosis 50 μ g/g BB	8.200	11.733	9.667	8.200
Fraksi 2, dosis 16 μ g/g BB	8.600	12.533	10.267	8.400
Fraksi 2, dosis 8 μ g/g BB	8.267	12.933	10.400	7.983
Fraksi 3, dosis 100 μ g/g BB	8.733	13.333	11.267	9.600
Fraksi 3, dosis 50 μ g/g BB	7.200	10.833	8.833	7.550
Fraksi 3, dosis 16 μ g/g BB	6.967	10.633	8.967	7.533
Fraksi 3, dosis 8 μ g/g BB	8.467	15.067	12.867	10.233
Fraksi 4, dosis 100 μ g/g BB	8.233	9.867	9.133	8.200
Fraksi 4, dosis 50 μ g/g BB	6.600	8.467	7.417	6.633
Fraksi 4, dosis 16 μ g/g BB	7.400	8.933	8.167	7.300

Perlakuan	Jumlah Leukosit Rata-rata/ μ l Darah			
	Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Fraksi 4, dosis 8 μ g/g BB	7.200	8.633	7.833	7.233
Fraksi 5, dosis 100 μ g/g BB	9.267	11.700	9.867	8.400
Fraksi 5, dosis 50 μ g/g BB	9.067	11.000	10.067	8.400
Fraksi 5, dosis 16 μ g/g BB	6.500	8.467	7.467	6.200
Fraksi 5, dosis 8 μ g/g BB	7.683	9.633	8.550	7.400

Tabel 3. Persentase rata-rata kenaikan leukosit total/ μ l darah setiap pemberian fraksi parrang romang.

Perlakuan	Persentase Kenaikan (%)
Kontrol Positif (Levamisol)	58.25%
Kontrol Negatif (Na CMC 1 %)	1.56%
Fraksi 1	
Dosis 100 μ g/g BB	35.17%
Dosis 50 μ g/g BB	32.61%
Dosis 16 μ g/g BB	62.30%
Dosis 8 μ g/g BB	31.03%
Fraksi 2	
Dosis 100 μ g/g BB	23.30%
Dosis 50 μ g/g BB	43.08%
Dosis 16 μ g/g BB	45.73%
Dosis 8 μ g/g BB	56.44%
Fraksi 3	
Dosis 100 μ g/g BB	52.67%
Dosis 50 μ g/g BB	50.46%
Dosis 16 μ g/g BB	52.62%
Dosis 8 μ g/g BB	77.95%
Fraksi 4	
Dosis 100 μ g/g BB	19.85%
Dosis 50 μ g/g BB	28.29%
Dosis 16 μ g/g BB	20.72%
Dosis 8 μ g/g BB	19.90%
Fraksi 5	
Dosis 100 μ g/g BB	26.25%
Dosis 50 μ g/g BB	21.32%
Dosis 16 μ g/g BB	30.26%
Dosis 8 μ g/g BB	25.38%

IV.2 Pembahasan

Sampel daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) yang telah dikeringkan dan dipotong-potong kecil, diekstraksi dengan metode maserasi yang merupakan metode penyarian secara dingin dan paling sederhana di antara metode lain, yaitu dengan cara merendam sampel dalam cairan penyari yang sesuai. Metode maserasi dipilih karena memperhatikan sifat fisik daun yang lunak. Sampel dimaserasi dengan cairan penyari metanol untuk mengekstraksi komponen kimia baik yang polar maupun non polar.

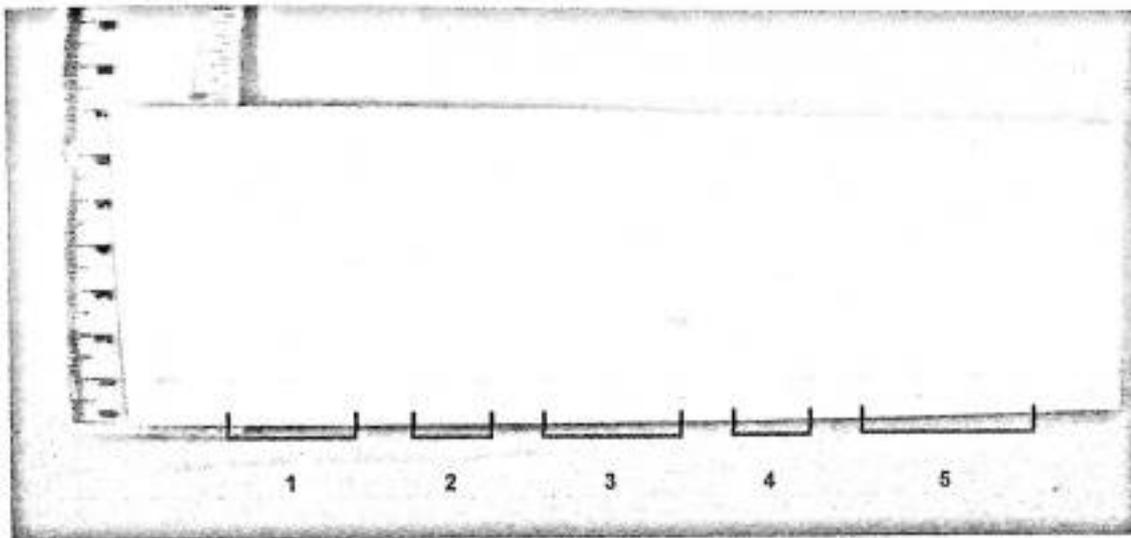
Daun parrang romang yang telah kering dipotong-potong kecil terlebih dahulu untuk memperluas permukaan sampel sehingga kontak dengan cairan penyari lebih luas, dan proses penyarian dapat berlangsung dengan baik. Sebelum diekstraksi, sampel direndam terlebih dahulu dengan cairan penyari metanol secukupnya dan dibiarkan terendam selama 12 jam. Hal ini dilakukan karena pada saat dikeringkan, lapisan air dalam sel daun menguap sehingga terjadi pengerutan dan pori-pori kemudian berisi udara. Agar penyarian dapat berjalan dengan baik, maka udara dalam pori-pori harus dihilangkan dan diganti dengan cairan penyari. Proses ini disebut pembasahan dan dimaksudkan untuk memberikan kesempatan yang sebesar-besarnya kepada cairan penyari memasuki seluruh pori-pori dalam sampel sehingga mempermudah ekstraksi selanjutnya.

Ekstrak metanol kental yang diperoleh selanjutnya dipartisi dengan metode cair padat dan diperoleh ekstrak n-Heksan dan bagian yang tidak larut n-Heksan. Pemisahan ekstrak metanol kental dengan n-Heksan bertujuan untuk memisahkan antara senyawa yang bersifat polar dan nonpolar dari ekstrak metanol. Pelarut n-Heksan bersifat nonpolar sehingga akan melarutkan senyawa yang bersifat nonpolar. Prinsip ini dikenal sebagai sifat "*like dissolve like*", artinya pelarut akan melarutkan senyawa yang tingkat kepolarannya sama dengan pelarut tersebut (25).

Untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik, ekstrak n-Heksan, bagian tidak larut n-Heksan dan ekstrak metanol awal sebagai pembanding dimonitor profil komponen kimianya secara kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel F 254 dan fase gerak heksan-etil asetat (6:1). Profil KLT telah menunjukkan pemisahan kelompok senyawa pada visualisasi dengan sinar UV 254 nm, UV 366 nm dan pereaksi semprot H₂SO₄ 10% (gambar 7)

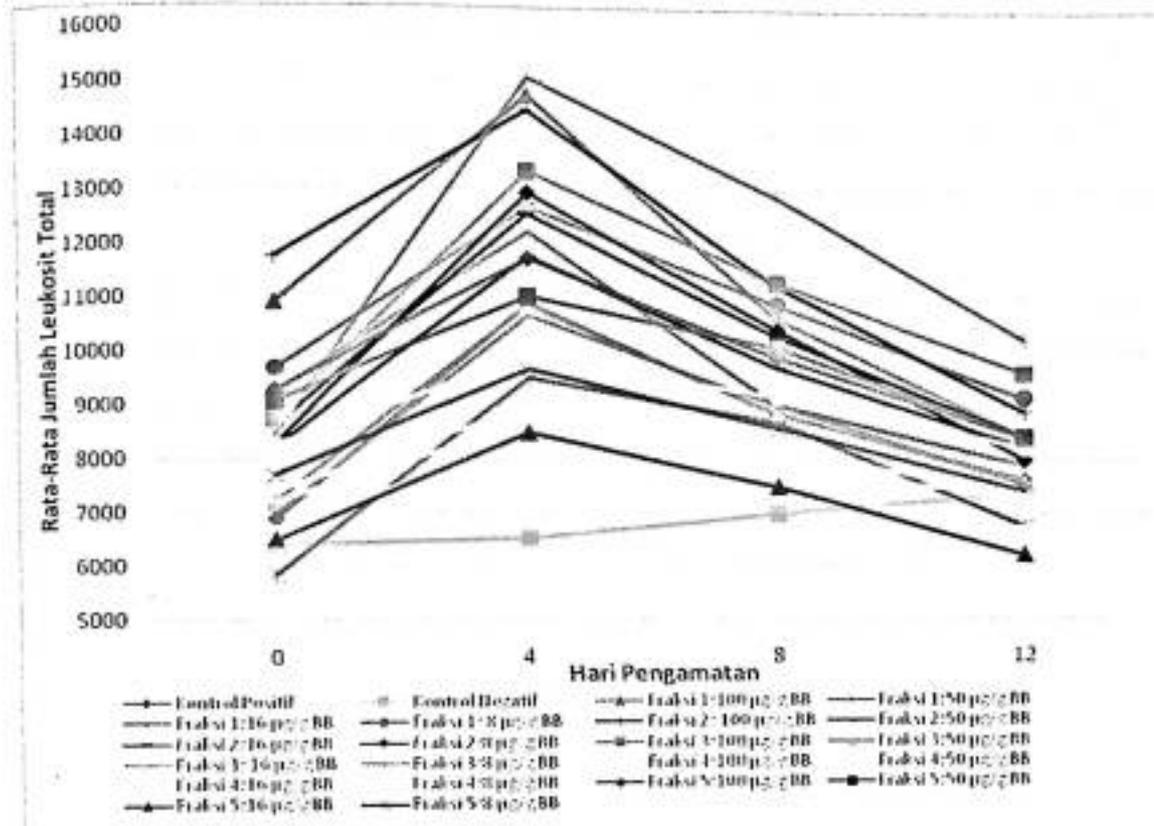
Ekstrak n-Heksan hasil partisi cair padat difraksinasi lebih lanjut menggunakan kolom kromatografi cair vakum dengan eluen yang dibuat bergradien tingkat kepolarannya, dimulai dari yang paling kurang polar yaitu heksan kemudian berturut-turut heksan-etil asetat (25:1; 20:1; 15:1; 10:1; 10:1; 5:1; 5:1; 1:1); etil asetat, etil asetat-metanol (1:1; 1:5); dan metanol (2 kali). Elusi bergradien dilakukan agar senyawa dapat terpisah-pisah dengan baik berdasarkan derajat kepolarannya.

Hasil pemisahan ekstrak n-Heksan dengan metode kromatografi cair vakum diperoleh 14 fraksi dan selanjutnya fraksi tersebut digabung berdasarkan kesamaan profil KLT dan dari proses ini didapatkan 5 fraksi gabungan. Profil KLT hasil kromatografi cair vakum dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 5. Profil kromatografi lapis tipis hasil kromatografi cair vakum ekstrak n-Heksan. 1 = fraksi gabungan 1; 2 = fraksi gabungan 2; 3 = fraksi gabungan 3; 4 = fraksi gabungan 4; 5 = fraksi gabungan 5. (Panjang lempeng 8 cm; lebar lempeng 15 cm; jarak elusi 6,5 cm; fase diam silika gel F 254; fase gerak heksan-etil asetat 6 : 1; visualisasi dengan H_2SO_4 10%)

Peningkatan jumlah leukosit total yang diamati pada sebelum dan hari ke 4, 8 dan 12 setelah perlakuan dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 6. Grafik perubahan jumlah leukosit total sebelum dan setelah perlakuan

Berdasarkan rasio perubahan jumlah leukosit total yang ditunjukkan pada histogram diatas, nampak adanya peningkatan jumlah leukosit total pada hari ke-4 dan kembali menurun pada hari ke 8 dan hari ke-12. peningkatan jumlah leukosit total pada kelompok kontrol positif dan kelompok yang diberi suspensi fraksi lebih besar dari kelompok kontrol negatif, sehingga dapat dikatakan kontrol positif dan fraksi meningkatkan jumlah leukosit total. Hal ini didukung dengan pernyataan bahwa leukosit setelah dikeluarkan dari tempat pembentukannya hanya memiliki waktu bersirkulasi yang singkat dalam darah (6-10 jam untuk granulosit dan 20-40 jam untuk monosit) kemudian masuk dalam jaringan untuk

melaksanakan fungsinya (18,18). Histogram diatas juga menunjukkan bahwa peningkatan jumlah leukosit tertinggi terjadi pada fraksi 3 dengan dosis 8 µg BB mencit dengan persentase rata-rata kenaikan adalah sebesar 77,95% (Tabel 3)

Efek hasil fraksinasi ekstrak n-heksan daun parrang dengan dosis 100, 50, 15, dan 8 µg BB mencit berefek meningkatkan jumlah leukosit. Rata-rata peningkatan leukosit fraksi I sebesar 35,17%, 32,61%, 62,30%, 31,03%. Fraksi II sebesar 23,30%, 43,08%, 45,73%, 56,44%. Fraksi III sebesar 52,67%, 50,46%, 52,62%, 77,95%. Fraksi IV sebesar 19,85%, 28,29%, 20,72%, 19,90%. Fraksi V sebesar 26,25%, 21,32%, 30,26%, 25,38%. Hal ini berarti peningkatan konsentrasi tidak selalu diikuti oleh peningkatan efek dari ekstrak tersebut.

Levamisol, dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif, merupakan salah satu obat imunostimulator yang digunakan dalam terapi. Imunostimulasi adalah cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut. Bahan yang dapat merubah respon imun, biasanya meningkatkan, disebut *Biological Response Modifiers* (BRM) atau imunostimulator. Pada sel-sel tumor, ekspresi antigen transplantasi diperkuat oleh imunostimulator, sehingga lebih mudah dikenali oleh TNF dan sel-sel sitotoksis (3,24). Levamisol dapat meningkatkan proliferasi dan sitotoksitas sel T, juga meningkatkan efek berbagai bahan seperti antigen, limfokin, dan faktor kemotaktik untuk merangsang limfosit, granulosit dan makrofag. Levamisol diberikan dalam

dosis 2,5 mg / kg BB secara oral dan untuk terapi kanker diberikan 150 mg per hari selama 2 atau 3 hari dan diulang tiap 10 hari sampai 2 minggu (3,17,26).

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan rancangan faktorial menunjukan bahwa sediaan uji dan hari pengamatan berpengaruh sangat nyata pada perubahan jumlah leukosit total. Analisis lanjutan menggunakan uji beda jarak nyata Duncan menunjukan bahwa kontrol negatif berbeda sangat nyata dengan kontrol positif, fraksi 1 dengan dosis 100, 50 dan 8 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, fraksi 2 dengan dosis 100, 50, 16, dan 8 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, fraksi 3 dengan dosis 100 dan 8 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, fraksi 5 dengan dosis 100 dan 16 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, dan berbeda nyata dengan fraksi 4 dengan dosis 50 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, terhadap perubahan jumlah leukosit total mencit. Kontrol positif berbeda tidak nyata dengan fraksi 1 dengan dosis 16 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, fraksi 3 dengan dosis 50 dan 16 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, fraksi 4 dengan dosis 100, 16 dan 8 $\mu\text{g/gBB}$ dan fraksi 5 dengan dosis 50 dan 8 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, terhadap perubahan jumlah leukosit total.

Leukosit dan sel-sel jaringan didalamnya terlibat dalam pertahanan selular dan humoral terhadap materi asing, termasuk diantaranya sel kanker. Mekanisme humoral pada destruksi kanker adalah melalui lisis oleh antibodi dan komplemen, opsonisasi melalui antibodi dan komplemen dan hilangnya adhesi oleh antibody. Mekanisme selular pada destruksi kanker adalah melalui destruksi oleh sel CTI/Tc, sel NK dan makrofag. Sel yang berperan sebagai efektor dalam mekanisme humoral adalah

monosit/makrofag dan leukosit polimorfonuklear (granular), sedangkan pada mekanisme humoral yang menjadi sel efektor adalah sel CT1/Tc, monosit, dan sel NK (3,5).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh hasil fraksinasi ekstrak n-Heksan daun parrang romang terhadap sistem imun melalui peningkatan aktivitas leukosit dengan melihat peningkatan jumlah leukosit total. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat dikatakan bahwa hasil fraksinasi tersebut mempunyai efek sebagai antikanker dengan aktifitas imunostimulator. Akan tetapi, dari teori dan pembahasan yang dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan aktivitas leukosit berhubungan dengan peningkatan sistem imun, secara tidak langsung dapat dihubungkan dengan imunoterapi bagi penanganan kanker, melalui perbanyakkan leukosit dan sel-sel jaringan didalamnya, dan juga meningkatkan aktivitasnya untuk pelepasan sitokin yang dapat menghambat atau membunuh sel tumor.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Fraksi ekstrak n-Heksan daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) dapat meningkatkan jumlah leukosit total pada hari ke-4 setelah perlakuan.
2. Fraksi yang memiliki aktivitas yang berbeda tidak nyata dengan kontrol positif (levamisol) adalah fraksi 1 dengan dosis 16 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, dengan persentase rata-rata kenaikan adalah sebesar 62,30%.
3. Fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi adalah fraksi 3 dengan dosis 8 $\mu\text{g/gBB}$ mencit, dengan persentase rata-rata kenaikan adalah sebesar 77,95%.

V.2 Saran

Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut dari hasil fraksinasi ekstrak n-Heksan daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) yang dapat meningkatkan jumlah leukosit total dan aktivitas T Helper.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sukardja IDG. *Onkologi Klinik*. Edisi II. Airlangga University Press. Surabaya. 2000. hal. 261-266.
2. Mukadar, S.S. (2006), Efek Ekstrak Metanol Daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) Terhadap Aktivitas Immunoglobulin G Darah Mencit Jantan (*Mus musculus*). Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Makassar, 27.
3. Manggau Marianti, Yusriadi, Mufidah, dan Gemin Alam (2007), Efek Antiproliferasi Ekstrak Daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) terhadap Sel Kanker HeLa, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, vol 11 No. 3, 75-79.
4. Lesson CR. Lesson TS. Paparo AA. *Buku Ajar Histologi*. Ed. 5. 1990. Terjemahan oleh Jan Tambayong. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; Jakarta; 1996. hal. 161-165.
5. Abbas AK. Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Elseiver Saunders. Philadelphia. 2005. hal. 391-410.
6. Halim B. Sahil MF. *Imunologi Kanker*. CDK. 2001(dikutip 10 Oktober 2008); No. 132. 47-50. Available from: http://www.kalbe.co.id/files/cdk/16_imunologi_kanker.pdf/16_imunologi_kanker.html
7. Baratawidjaja KG. *Imunologi Dasar*. Ed. 6. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2004. hal. 14, 48-50, 58, 66, 363-373, 412.
8. Brink M. Escobin RP. *Plant Resources of South-East Asia*. Fibre Plants. Backhuys Publishers. Leiden. 2003. hal. 86-91.
9. Tjitrosoepomo G. *Taksonomi Tumbuhan (Spematophyta)*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 2004. hal. 111.
10. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Ed. 3. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 9.
11. Harbone JB. *Metode Fitokimia*. 1984 Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung; Penerbit ITB; 1996. hal. 6-9.

12. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Sediaan Galenik*. Ed. 2. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 10.
13. Sastrohamidjoho H. *Kromatografi*. Penerbit Liberty. Yogyakarta. 2007.
14. Stahl E. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopis*. 1973. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung; Penerbit ITB; 1985. hal. 3-4.
15. Houghton PJ. Raman A. *Laboratory Handbook for The Fractionation Of Natural Extracts*. Chapman & Hall. London.
16. Guyton AC. Hall JE. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Ed. 9. 1996. Terjemahan oleh Irawati Setiawan dkk. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1997. hal. 543-569.
17. Price SA. Wilson LM. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyebaran Penyakit*. Ed. 6. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2005. hal. 268-270.
18. Hoffbrand AV. Pettit JE. Moss PAH. *Kapita Selekta Hematologi*. Ed. 4. 2001. Terjemahan oleh Lyana Setiawan. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2005. hal. 1-4, 104-107, 116-118.
19. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 1995. *Histologi Dasar*. Ed. 2. Terjemahan oleh Jan Tambayong. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1998. hal. 230-240, 243-246, 250-255.
20. Guyton AC. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit*. Terjemahan oleh Petrus Andriato. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1987. hal. 59.
21. Cormack DH. *Ham Histologi*. 1992. Terjemahan oleh Jan Tambayong. Jakarta; Binarupa Aksara; 1994. hal. 258-260.
22. Dharma R. Immanuel S. Wirawan R. Penilaian Hasil Pemeriksaan Hematologi Rutin. *CDK*. 1983 (dikutip 10 Oktober 2008). No. 30. Available from: http://www.kalbe.co.id/cdk/files/cdk_030_diagnosis_laboratorium.pdf
23. Gandasoebrata R. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Dian Rakyat. Jakarta. 2006. hal. 15-18.

24. Irawan R. Silman E. *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Sederhana*. Ed. 2. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 1996. hal. 12-18.
25. Adnan M. *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Makanan*. Penerbit Andi. Yogyakarta. 1997. hal. 5.
26. Tan HT. Rahardja K. *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya*. Ed. 5. PT. Elex Media Komputindo Gramedia. Jakarta. 2002. hal. 215, 740.
27. Malole MBM. Pramono CSU. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 1989. hal. 96-97.