



**FRAKSINASI DAN UJI EFEK PENINGKATAN  
AKTIVITAS LEUKOSIT MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN  
DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN PARRANG ROMANG  
(*Boehmeria virgata* Guillem)**

**DONALD EMILIO KALONIO  
N111 06 906**



PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. Terima	26-6-09
Asal/Dari	farmasi
Banyaknya	1 dus
Marga	Haris
No. Inventaris	04

SKR-F09  
KAL  
F

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



**FRAKSINASI DAN UJI EFEK PENINGKATAN AKTIVITAS LEUKOSIT  
MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN  
DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN PARRANG ROMANG  
(*Boehmeria virgata* Guillem)**

**SKRIPSI**

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

**DONALD EMILIO KALONIO  
N111 06 906**

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

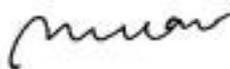
FRAKSINASI DAN UJI EFEK PENINGKATAN AKTIVITAS LEUKOSIT  
MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN  
DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN PARRANG ROMANG  
(*Boehmeria virgata* Guillem)

DONALD EMILIO KALONIO

N111 06 906

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Dr.rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt  
NIP. 132 010 567

Pembimbing Pertama,



Mufidah, S.Si., M.Si., Apt.  
NIP. 132 240 180

Pembimbing Kedua,



Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.  
NIP. 132 298 927

Pada tanggal Mei 2009

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis sampaikan kehadiran Tuhan Yesus Kristus karena atas kasih dan penyertaanNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini. Namun berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Ibu Dr.rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt selaku pembimbing utama, Ibu Mufidah, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing pertama dan Bpk. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt selaku pembimbing kedua sekaligus penasehat akademik penulis, atas waktu, bimbingan dan nasehat-nasehatnya selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi UNHAS sampai terselesaikannya skripsi ini.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Farmasi UNHAS beserta seluruh staf, Kepala Laboratorium Biofarmasi dan Kepala Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi UNHAS beserta staf, atas segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

Terima kasih kepada teman-teman mahasiswa Fakultas Farmasi angkatan 2004, 2005 dan 2006, terkhusus teman-teman seperjuangan Sesilia Bulu Odel, S.Si., Agustina Juliana L. S.Si., Elfira Loura L. S.Si.,

Sunarti S. S.Si., Adrian F., Indrawati, Yenni R., Sri Ramadhani, Sri Handayani dan Iva I. N., atas bantuan dan dukungannya. Teman seperjuangan dalam penelitian Andre Yudhinata S., dan teman-teman penelitian di Laboratorium Biofarmasi. Terima kasih pula penulis sampaikan untuk Lukman M., Ibu Syamsiah A.Md. dan Bpk. M. Suaib yang telah memberikan perhatian dan bantuan selama pelaksanaan penelitian.

Akhirnya semua ini tiada artinya tanpa dukungan moril dari kedua orang tua tercinta, papa Tonny Piet Lee Kalonio dan mama Maria Isye Manoppo (Alm) serta kedua adikku Sendhy Randy Johanis Kalonio dan Nicky Valentino Kalonio. Tidak lupa pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Bpk. Corinus Seba sekeluarga yang telah menerima penulis untuk tinggal bersama dirumahnya sewaktu penulis pertama kali menginjakan kaki di Makassar.

Akhirnya semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Amin.

Makassar, Mei 2009

Donald Emilio Kalonio

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang fraksinasi dan uji efek peningkatan aktivitas leukosit mencit (*Mus musculus*) jantan dari ekstrak etil asetat daun parrang romang (*Boehmeria virgata* Guillem). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun parrang romang terhadap aktivitas leukosit dengan melihat peningkatan jumlah leukosit total. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut metanol dan selanjutnya dipartisi dengan etil asetat, hingga diperoleh ekstrak etil asetat. Ekstrak etil asetat 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 14 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 XIV diberi suspensi fraksi-1, -2, -3 dan -4 dengan dosis 25, 17, dan 8,3 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 dosis 25 dan 17 µg/g BB, fraksi 2 dosis 25 dan 17 µg/g BB, fraksi 3 dosis 25; 17 dan 8,3 µg/g BB, dan fraksi 4 dosis 25 µg/g BB dapat meningkatkan jumlah leukosit total dengan aktivitas tertinggi terjadi pada fraksi 3 dosis 17 µg/g BB. Peningkatan tertinggi terjadi setelah hari ke 4 setelah perlakuan.

## ABSTRACT

Fractination of ethyl acetate extract parrang romang leaves (*Boehmeria virgata* Guillem) and it's effect test on the enhancement leukocyte activity in male mice (*Mus musculus*) had been conducted. The research was aimed to know about effect of fractionation result ethyl acetate extract to enhance immune system with increasing total leukocyte. The extraction was done by maceration with methanol and then be partioned by ethyl acetate until produced the ethyl acetate extract. The ethyl acetate extract then fractionated by column vacuum liquid chromatography. The chemical compounds 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 14 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-1, -2, -3 and -4 with dose 25; 17; 8,3  $\mu\text{g/g}$  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 fraction 1 dose 25; 17  $\mu\text{g/g}$  BW mice, fraction 2 dose 25; 17  $\mu\text{g/g}$  BW mice, fraction 3 dose 25; 17; 8,3  $\mu\text{g/g}$  BW mice and fraction 4 dose 25  $\mu\text{g/g}$  BW mice could increasing total leukocyte with optimum activity on fraction 3 dose 17  $\mu\text{g/g}$  BW mice. High increasing was occured on fourth day after administrated.

## DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xiv
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.....	13
II.4.1.4 Pematangan Limfosit dan Monosit.....	13
II.4.2 Jenis-Jenis Leukosit.....	15
II.4.2.1 Leukosit Granular.....	15
II.4.2.2 Leukosit Agranular.....	20
II.5 Immunologi Kanker.....	29
II.5.1 Respon Sistem Imun Terhadap Sel Kanker.....	30
II.5.1.1 Imunitas Humoral Terhadap Kanker.....	30
II.5.1.2 Imunitas Seluler Terhadap Kanker.....	31
II.5.2 Surveillance Imunitas.....	33
II.5.3 Immunological Escape.....	34
II.6 Hitung Leukosit Total.....	35
<b>BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....</b>	<b>37</b>
III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan.....	37
III.2 Penyiapan Sampel Penelitian.....	37
III.2.1 Penyiapan Sampel.....	37
III.2.2 Ekstraksi Sampel.....	38
III.2.3 Partisi Pelarut.....	38
III.2.4 Isolasi dengan Kolom Kromatografi Cair Vakum.....	39

III.2.4.1 Penyiapan Kolom Kromatografi Cair Vakum.....	39
III.2.4.2 Penyiapan Sampel Kolom Kromatografi Cair Vakum.	39
III.2.4.3 Fraksinasi Komponen Kimia.....	39
III.3 Pembuatan Sediaan Uji .....	40
III.3.1 Pembuatan Larutan Koloidal Na CMC 1% .....	40
III.3.2 Pembuatan Suspensi Levamisol.....	40
III.3.3 Pembuatan Suspensi Fraksi .....	40
III.4 Pelaksanaan Uji Efek Peningkatan Aktivitas Leukosit Mencit	41
III.4.1 Penyiapan dan Pemilihan Hewan Uji .....	41
III.4.1.1 Penyiapan Hewan Uji.....	41
III.4.1.2 Pemilihan Hewan Uji .....	42
III.4.2 Perlakuan Terhadap Hewan Uji .....	42
III.5 Perhitungan Jumlah Leukosit Total .....	42
III.6 Pengumpulan dan Analisis Data .....	43
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
IV.1 Hasil Pengamatan .....	44
IV.2 Pembahasan.....	45
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>52</b>
V.1 Kesimpulan.....	52
V.2 Saran .....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>53</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>56</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Ukuran dan jumlah leukosit manusia.....	15
2. Hasil perhitungan jumlah leukosit total .....	44
3. Data hasil perhitungan jumlah leukosit total .....	62
4. Hasil analisis sidik ragam pengaruh utama dan interaksi sediaan uji dan hari pengamatan terhadap jumlah leukosit.....	65
5. Perbandingan rata-rata keragaman sediaan uji.....	66
6. Perbandingan rata-rata keragaman hari.....	68

## 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 .....	16
5. Profil kromatografi lapis tipis hasil kromatografi cair vakum ekstrak etil asetat.....	47
6. Histogram perubahan jumlah leukosit total sebelum dan setelah perlakuan.....	48
7. Profil kromatografi lapis tipis ekstrak metanol awal, ekstrak etil asetat dan bagian tidak larut etil asetat .....	69
8. Profil kromatografi lapis tipis hasil kromatografi cair vakum dengan penampak noda UV 254, 366 nm dan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%.....	70
9. Foto larutan Turk .....	71
10. Foto darah yang telah diencerkan dengan larutan Turk sebelum perhitungan jumlah leukosit total .....	71
11. Foto pengamatan jumlah leukosit total.....	72
12. Foto kamar hitung Improved Neubaur .....	72
13. Foto tanaman parrang romang .....	73
14. Daun parrang romang .....	73

## 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.....	61
7. Analisis statistika data hasil perhitungan jumlah leukosit total.....	62
8. Gambar-gambar pelaksanaan dan hasil penelitian .....	69
9. Hasil determinasi tanaman parrang romang.....	74

## 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

Pertahanan tubuh melawan infeksi adalah peran utama leukosit atau sel darah putih. Leukosit pada umumnya ikut serta dalam pertahanan selular dan humoral organisme terhadap benda asing dan melakukan fungsinya dalam jaringan ikat (1,2).

Banyak data menunjukkan bahwa faktor imunitas mempunyai pengaruh yang besar pada pertumbuhan dan terapi kanker. Beberapa dugaan akan adanya keterlibatan sistim imun dalam kanker antara lain regresi spontan kanker, melanoma yang sembuh sendiri, regresi metastasis setelah reseksi neoplasma primer, regresi kanker setelah dosis nonsitotoksik kemoterapi, munculnya kembali metastasis setelah periode laten yang lama, kegagalan sel kanker yang bersirkulasi dalam darah untuk membentuk daerah metastasis, infiltrasi kanker oleh sel mononuklear, insidensi kanker yang lebih tinggi pada penderita imunodefisiensi, setelah imunosupresi klinis, dan peningkatan kejadian keganasan pada usia tua (3,4).

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 (4,5).

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 (3).

Kemajuan yang telah dicapai dalam pengembangan berbagai vaksin dan obat-obat yang digunakan untuk memperbaiki sistem imun yang disebut immunostimulator, digunakan untuk memerangi infeksi dan mengobati kanker. Immunostimulator secara tak langsung berkhasiat mereaktivasi sistem imun yang rendah antara lain dengan meningkatkan perbanyakan limfosit-T, NK cells dan makrofag, dan juga meningkatkan aktivitas sel-sel tersebut untuk pelepasan sitokin (6).

Tanaman Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem) termasuk dalam suku Urticaceae. Daunnya sering digunakan sebagai obat kanker oleh masyarakat daerah Toraja, Sulawesi Selatan. Skrining antikanker terhadap sel kanker HeLa dan sel kanker kandung kemih manusia 5637 telah dilakukan terhadap ekstrak etil asetat daun Parrang Romang

(*Boehmeria virgata* Guillem). Dari hasil perhitungan metode analisis probit diperoleh nilai  $IC_{50}$  12,096  $\mu\text{g/ml}$  dan 3,96  $\mu\text{g/ml}$  (7,8).

Mekanisme kerja daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem) sebagai antikanker saat ini belum diketahui. Ekstrak etil asetat daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem) diketahui tidak memiliki aktivitas antioksidan ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ ), melalui penelitian yang dilakukan dengan menggunakan DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) (8). Penelitian selanjutnya telah melaporkan bahwa ekstrak etil asetat daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem) dapat memperbanyak limfosit darah mencit (9).

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem) terhadap sistem imun melalui peningkatan aktivitas leukosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek fraksi etil asetat daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem) terhadap aktivitas leukosit dengan melihat peningkatan jumlah leukosit total sebelum dan sesudah perlakuan, sehingga diperoleh fraksi aktif yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun melalui peningkatan jumlah leukosit.

## 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 (10,11)

##### 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 (10,11).

## **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 (12).

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 (13).

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 (14).

### **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 (14).

### **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 (13).

#### **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 (15).

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. (16).

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 (15).

### **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 (17).

#### 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 (18). Lima jenis sel darah putih yang sudah diidentifikasi dalam darah perifer adalah neutrofil, eosinofil, basofil, monosit dan limfosit (1).

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 (18).

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

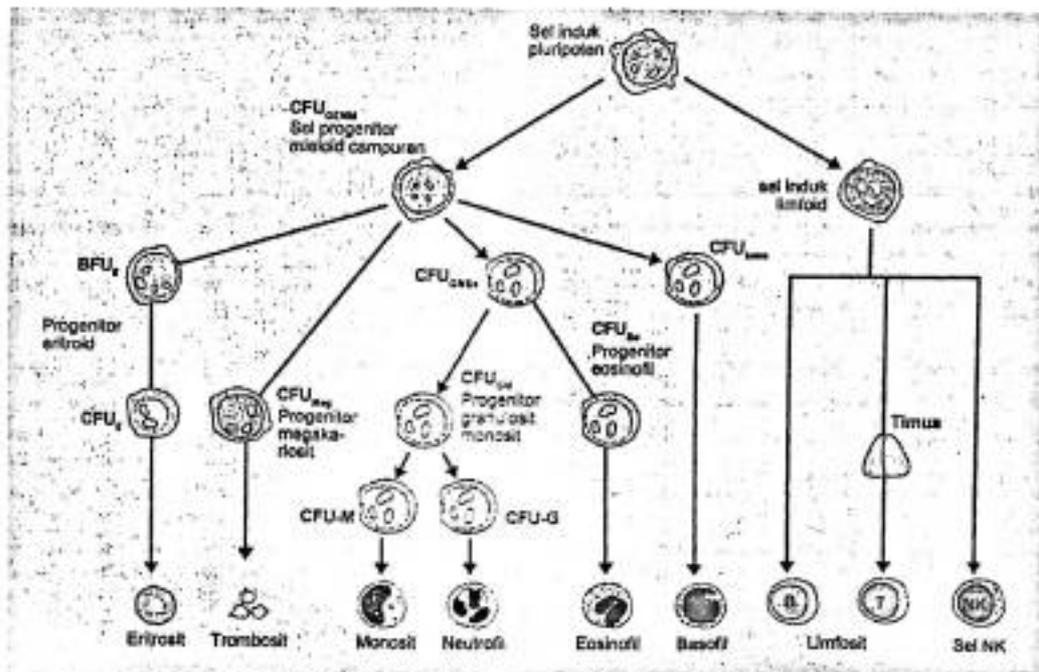
fagositosis. Leukosit pada umumnya ikut serta dalam pertahanan selular dan humoral organisme terhadap benda asing dan melakukan fungsinya dalam jaringan ikat (2).

#### **II.4.1 Pembentukan Leukosit (19,20)**

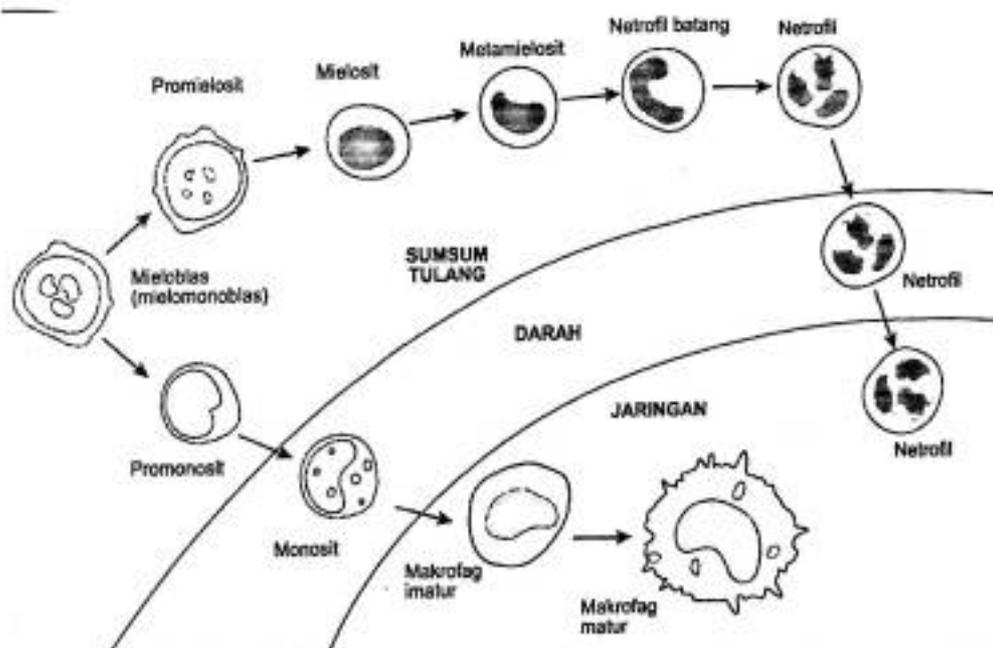
Sel darah matang mempunyai jangka hidup relatif pendek, dan karenanya populasi itu harus secara tetap diganti turunan sel induk yang dihasilkan oleh organ hematopoietik (Yun. *haima*, darah, *poiesis*, pembuatan). Sebelum mencapai kematangan dan sudah dilepas ke dalam sirkulasi, sel-sel darah harus melalui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

##### **II.4.1.1 Tempat Terjadinya Hematopoiesis**

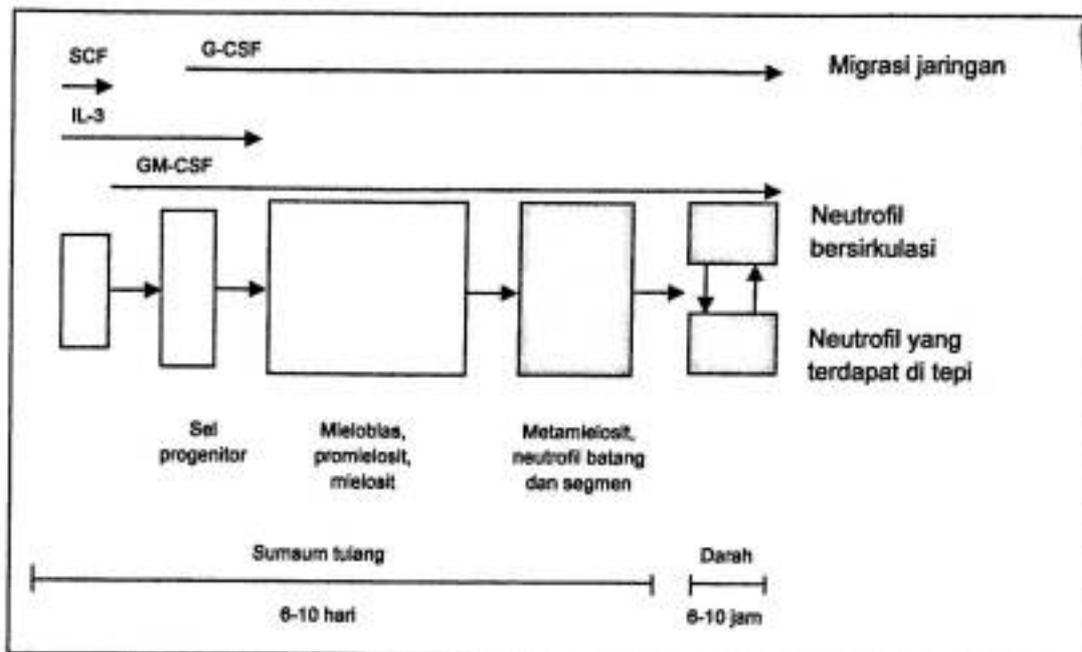
Pada tahap awal embriogenesis, kantung kuning telur (*yolk sac*) adalah tempat utama terjadinya hematopoiesis. Sejak usia 6 minggu sampai bulan ke 6-7 masa janin, hati dan limpa merupakan organ utama yang berperan dan terus memproduksi sel darah sampai sekitar 2 minggu setelah lahir. Sumsum tulang adalah 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. (Sumber : Hoffbrand AV. Pettit JE. Moss PAH. *Kapita Selekta Hematologi*. Ed. 4. 2001. Terjemahan oleh Lyana Setiawan. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2005, hal. 2)



Gambar 2. Pembentukan fagosit neutrofil dan monosit. Eosinofil dan basofil juga dibentuk dalam sumsum tulang dengan suatu proses yang serupa dengan neutrofil. (Sumber : Hoffbrand AV. Pettit JE. Moss PAH. *Kapita Selekta Hematologi*. Ed. 4. 2001. Terjemahan oleh Lyana Setiawan. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2005, hal 106)

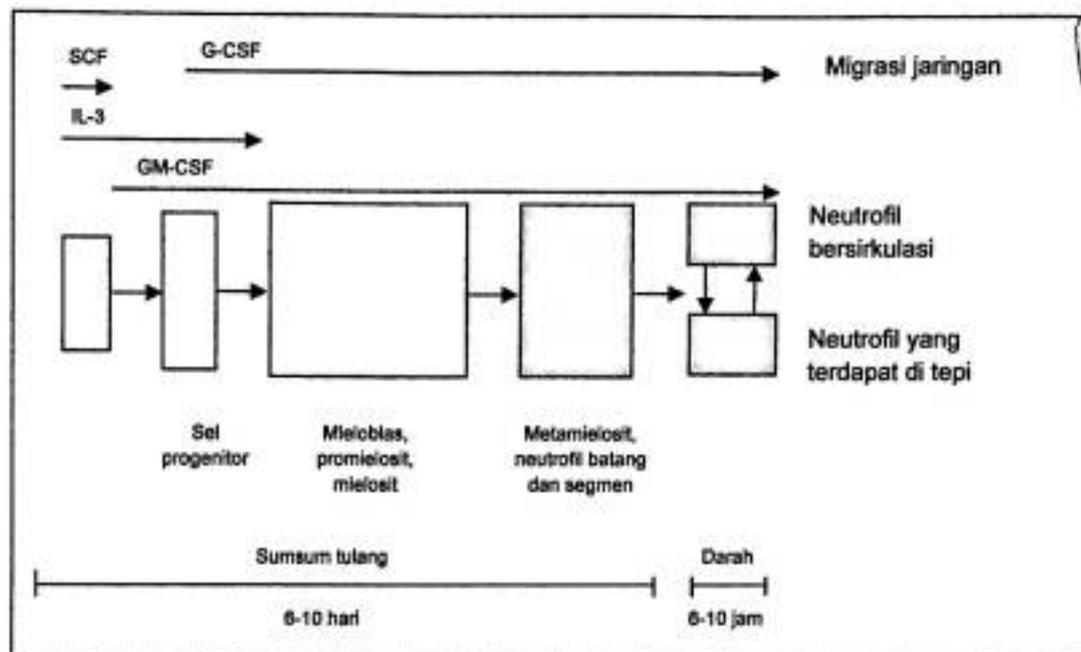


Gambar 3. Kinetika pembentukan neutrofil. (Sumber : Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. *Kapita Selekta Hematologi*. Ed. 4. 2001. Terjemahan oleh Lyana Setiawan. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2005, hal 107)

#### 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



Gambar 3. Kinetika pembentukan neutrofil. (Sumber : Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. *Kapita Selekta Hematologi*. Ed. 4. 2001. Terjemahan oleh Lyana Setiawan. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2005, hal 107)

#### 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 (1,2,19,20)

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

Tabel 1. Ukuran dan jumlah leukosit manusia

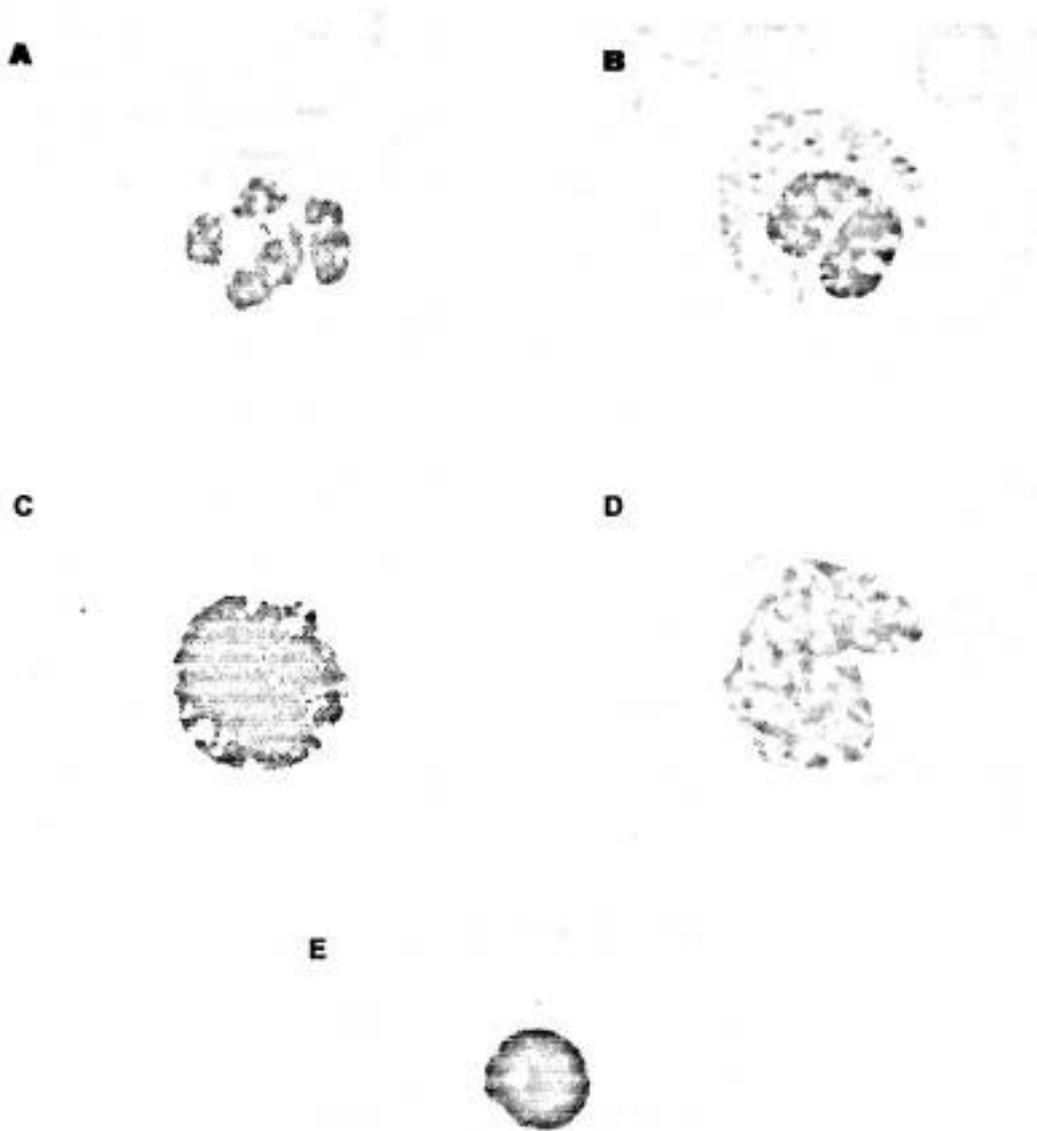
Sel	Ukuran	Jumlah
Leukosit		6000 - 10000 $\mu$ l
Neutrofil	12 - 15 $\mu$ m	60 - 70 %
Eosinofil	12 - 15 $\mu$ m	2 - 4 %
Basofil	12 - 15 $\mu$ m	0 - 1 %
Limfosit	6 - 18 $\mu$ m	20 - 30 %
Monosit	12 - 20 $\mu$ m	3 - 8 %

(Sumber : Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 1995. *Histologi Dasar*. Ed. 2. Terjemahan oleh Jan Tambayong. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1998. hal. 230).

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.



Gambar 4. Jenis-jenis leukosit. A = neutrofil; B = eosinofil; C = basofil; D = monosit; E = limfosit. (Sumber : Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. *Kapita Selekta Hematologi*. Ed. 4. 2001. Terjemahan oleh Lyana Setiawan. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2005, hal 105)

### 1. Neutrofil

Sel-sel ini merupakan 60-70 % dari leukosit yang bersirkulasi, garis tengahnya 12-15  $\mu\text{m}$ . 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 infeksi 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ . Intinya lonjong, berbentuk tapal kuda, atau berbentuk ginjal dan umunya 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 (20).

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 (19). Dalam jaringan tersebut monosit berinteraksi dengan limfosit (sel T) dan berperan penting dalam pengenalan dan interaksi dari sel imunokompeten dan antigen (20).

## 2. Limfosit

Limfosit adalah sel yang kompeten secara imunologik dan membantu fagosit dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi dan invasi asing lain (19).

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 (18).

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 (20).

#### 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) (5).

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 (5).

Sel T terdiri dari (5) :

##### - 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<sup>+</sup>

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<sup>+</sup> 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- $\gamma$  dan IL-12 yang diproduksi *Antigen Presenting Cell* (APC) seperti makrofag dan sel dendritik yang diaktifkan mikroba merangsang diferensiasi sel CD4<sup>+</sup> 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

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<sup>+</sup>. Molekul CD4<sup>+</sup> 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 *Fabricsius*. 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 Fabricsius tetapi pada manusia tidak ditemukan organ yang setara (19,21).

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 (5).

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 (18).

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 (18) :

- 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), granula sitoplasma azurofilik, pseudopodia dan nukleus eksentris (5).

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 (5).

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 influx ion abnormal dan kebocoran metabolit esensial dari sitoplasma. Sel-sel NK juga mengandung granula-granula berisikan TNF- $\beta$  dan protease serin yang disebut *granzyme*, contohnya fragmentin yang merupakan protein sitotoksik yang dilepas bila terjadi degranulasi sel NK. Sitotoksitas serupa diekspresikan oleh sel CTL/Tc yang juga mengandung perforin (5).

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- $\gamma$  yang mencegah penyebaran virus dari sel terinfeksi. Di samping sel NK, makrofag dan neutrofil juga berperan pada ADCC (5).

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 (5).

### **II.5 Imunologi Kanker (3,4,5,6)**

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 Imunoglobulin 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 surveillence imunitas tumor, dapat membunuh sel tumor tanpa perlu disensitasi terlebih dahulu. Dalam surveillence imunitas dianggap ada keadaan immunosupresi yang menyertai keadaan tumbuhnya tumor, terutama depresi sel NK.

### II.5.3 Immunological Escape

Walaupun ada sistem surveillence 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- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) 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) (22).

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 (23,24).

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 (24,25).

## BAB III

### PELAKSANAAN PENELITIAN

#### III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah kamar hitung (*Improved Neubauer*), mikroskop (*Novel*), timbangan analitik (*Sartorius*), timbangan gram (*Ohaus*), timbangan hewan (*Berkef*), seperangkat alat kromatografi cair vakum, labu tentukur 100 ml (*Pyrex*), mikropipet (*Socorex*), oven listrik (*Memmert*), pengocok, alat sentrifus (*Hettich*), bejana maserasi, bejana kromatografi, lampu UV 254 dan 366 nm.

Bahan-bahan yang digunakan adalah levamisol (*Askamex<sup>®</sup>*), daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem), air suling, Natrium CMC, metanol, etil asetat, heksan, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, larutan Turk, lempeng KLT Silika Gel F 254 (*E. Merck*) dan Silika Gel 60 PF 254 (*E. Merck*).

#### III.2 Penyiapan Sampel Penelitian

##### III.2.1 Penyiapan Sampel

Sampel daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Guillem) diambil dari Malino, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan. Sampel daun tersebut diambil pada pagi hari. Sampel daun yang dikumpulkan dibersihkan dari kotoran dan dicuci dengan air bersih lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, terlindung dari sinar matahari langsung.

Sampel yang telah kering kemudian dipotong-potong kecil dan siap digunakan sebagai bahan penelitian.

### **III.2.2 Ekstraksi Sampel**

Sampel yang telah dipotong-potong kecil sebanyak 500 g dimasukkan ke dalam bejana maserasi kemudian ditambahkan pelarut metanol secukupnya dan didiamkan terendam selama 12 jam, kemudian ditambahkan pelarut metanol sampai seluruh sampel terendam sempurna selama 3 hari sambil sesekali diaduk. 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 pelarut dilakukan dengan metode partisi cair padat. Sebanyak 30 gram ekstrak metanol kental ditambahkan etil asetat sebanyak 100 ml dan dihomogenkan dengan *magnetik stirrer* kemudian disentrifus sehingga terpisah antara ekstrak etil asetat sebagai supernatan dan bagian yang tidak larut sebagai endapan. Pengerjaan dilakukan berulang sehingga proses partisi sempurna. Untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik, ekstrak etil asetat 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 etil asetat 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 etil asetat 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 etil asetat 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; 5:1; 1:1); etil asetat, etil asetat-metanol (1:1; 1:5); dan metanol (2 kali). Fraksi-fraksi

yang diperoleh diuapkan kemudian dimonitor profil KLT-nya menggunakan fase gerak heksan-etil asetat (3:1) serta divisualisasi dengan sinar UV 254 nm, 366 nm, dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%. Fraksi dengan profil KLT yang sama digabung. Fraksi-fraksi gabungan tersebut kemudian diuji efek peningkatan aktifitas leukositnya.

### **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<sup>®</sup> (levamisol) ditimbang dan dihitung bobot rata-rata 1 tablet lalu kemudian diserbukan. Sebanyak 941,77 mg 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**

Dua belas fraksi hasil Kolom Kromatografi Cair Vakum yang telah digabung menjadi 4 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 8,3 µg/g BB mencit; 17 µg/g BB mencit dan 25 µg/g BB mencit. Untuk dosis 8,3 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,0249% b/v dibuat dengan menimbang fraksi sebanyak 24,9 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 17 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,051% b/v dan dosis 25 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,075% b/v digunakan cara yang sama dengan menimbang fraksi masing-masing 51 mg dan 75 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 42 ekor yang dibagi dalam 14 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

pembawa. Konsentrasi yang disiapkan untuk masing-masing fraksi disesuaikan dengan perhitungan dosis yaitu 8,3 µg/g BB mencit; 17 µg/g BB mencit dan 25 µg/g BB mencit. Untuk dosis 8,3 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,0249% b/v dibuat dengan menimbang fraksi sebanyak 24,9 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 17 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,051% b/v dan dosis 25 µg/g BB mencit yang setara dengan 0,075% b/v digunakan cara yang sama dengan menimbang fraksi masing-masing 51 mg dan 75 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 42 ekor yang dibagi dalam 14 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 XIV adalah kelompok perlakuan yang masing-masing diberi suspensi fraksi 1, 2, 3 dan 4 dengan dosis 8,3 µg/g BB mencit; 17 µg/g BB mencit dan 25 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 (24,25)

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 dan dilanjutkan dengan uji beda jarak nyata Duncan.

## 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 etil asetat dan diperoleh ekstrak etil asetat dan bagian tidak larut etil asetat. Fraksinasi ekstrak etil asetat menghasilkan empat fraksi yaitu fraksi 1, 2, 3, dan 4 (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 hasil perhitungan jumlah leukosit total

Perlakuan	Hari ke-0	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12
Kontrol Positif	6867	10867	8800	7600
Kontrol Negatif	6400	6500	6950	7350
Fraksi 1, dosis 25µg/g BB	6983	10333	8300	7187
Fraksi 1, dosis 17 µg/g BB	5800	11000	9133	6667
Fraksi 1, dosis 8,3 µg/g BB	5733	8716	7800	6900
Fraksi 2, dosis 25µg/g BB	6083	10600	9133	7450
Fraksi 2, dosis 17 µg/g BB	5667	10250	8133	7067
Fraksi 2, dosis 8,3 µg/g BB	5733	8950	7683	6850
Fraksi 3, dosis 25µg/g BB	5767	11467	9833	7733
Fraksi 3, dosis 17 µg/g BB	6800	13667	11133	8933
Fraksi 3, dosis 8,3 µg/g BB	6250	10500	8600	7000
Fraksi 4, dosis 25µg/g BB	5800	10850	7867	6883
Fraksi 4, dosis 17 µg/g BB	5900	9033	7133	6467
Fraksi 4, dosis 8,3 µg/g BB	6133	9217	7900	7117

## IV.2 Pembahasan

Sampel daun parrang romang (*Boehmeria virgata* Guillem) 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.

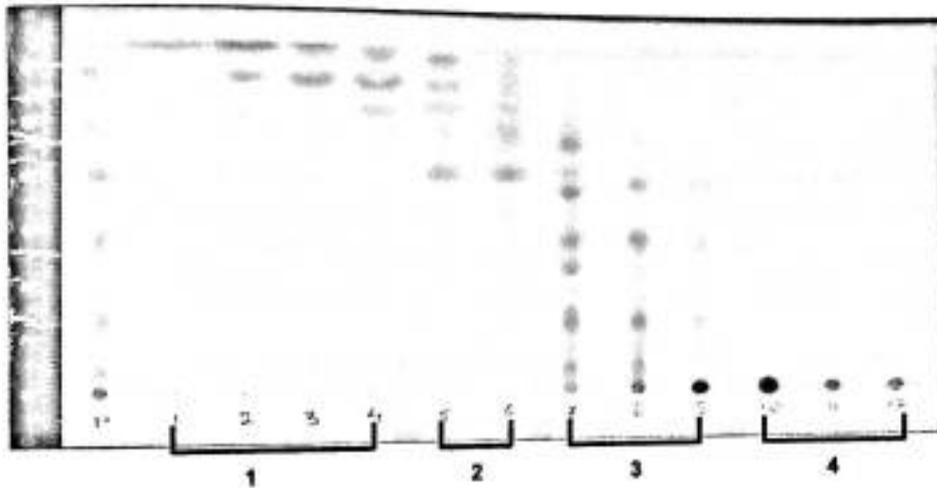
Daun parrang romang yang telah kering dipotong-potong kecil terlebih dahulu untuk memperluas permukaan sampel sehingga kontak dengan cairan penyari lebih luas, dan proses penyarian dapat berlangsung dengan baik. Sebelum diekstraksi, sampel direndam terlebih dahulu dengan cairan penyari metanol secukupnya 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 etil asetat dan bagian yang tidak larut etil asetat. Pemisahan ekstrak metanol kental dengan etil asetat bertujuan untuk memisahkan antara senyawa yang bersifat lebih polar dan kurang polar dari ekstrak metanol. Pelarut etil asetat bersifat kurang polar sehingga akan melarutkan senyawa yang bersifat kurang polar. Prinsip ini dikenal sebagai sifat "*like dissolve like*", artinya pelarut akan melarutkan senyawa yang tingkat kepolarannya sama dengan pelarut tersebut (26).

Untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik, ekstrak etil asetat, bagian tidak larut etil asetat 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 (3:1). Profil KLT telah menunjukkan pemisahan kelompok senyawa pada visualisasi dengan sinar UV 254 nm, UV 366 nm dan pereaksi semprot H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (gambar 7)

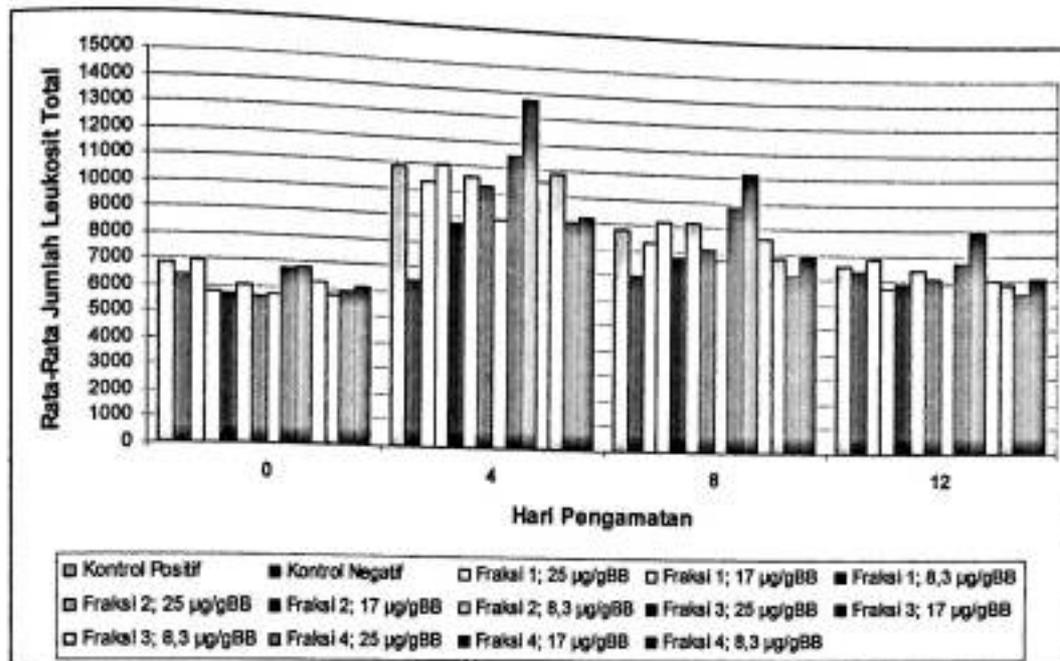
Ekstrak etil asetat hasil partisi cair padat difraksinasi lebih lanjut menggunakan kolom kromatografi cair vakum dengan eluen yang dibuat bergradien tingkat kepolarannya, dimulai dari yang paling kurang polar yaitu heksan kemudian berturut-turut heksan-etil asetat (25:1; 20:1; 15:1; 10:1; 5:1; 1:1); 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 etil asetat dengan metode kromatografi cair vakum diperoleh 12 fraksi dan selanjutnya fraksi tersebut digabung berdasarkan kesamaan profil KLT dan dari proses ini didapatkan 4 fraksi gabungan. Profil KLT hasil kromatografi cair vakum dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 5. Profil kromatografi lapis tipis hasil kromatografi cair vakum ekstrak etil asetat. 1 = fraksi gabungan 1; 2 = fraksi gabungan 2; 3 = fraksi gabungan 3; 4 = fraksi gabungan 4. (Panjang lempeng 8 cm; lebar lempeng 13 cm; jarak elusi 6,5 cm; fase diam silika gel F 254; fase gerak heksan-etil asetat 3 : 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. Histogram 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 (19,20). Histogram diatas juga menunjukkan bahwa peningkatan jumlah leukosit tertinggi terjadi pada fraksi 3 dengan dosis 17 µg/g BB mencit dengan persentase rata-rata kenaikan adalah sebesar 100, 99%.

mencit dan fraksi 4 dengan dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$  mencit, terhadap perubahan jumlah leukosit total mencit. Kontrol positif berbeda tidak nyata dengan fraksi 1 dengan dosis 25 dan 17  $\mu\text{g/gBB}$  mencit, fraksi 2 dengan dosis 25 dan 17  $\mu\text{g/gBB}$  mencit, fraksi 3 dengan dosis 25 dan 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dengan dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$  mencit, terhadap perubahan jumlah leukosit total. Analisis statistik juga menunjukkan bahwa jumlah leukosit total pada masing-masing hari pengamatan (hari ke-0, 4, 8 dan 12) berbeda sangat nyata.

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 CTI/Tc, monosit, dan sel NK (4,5).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh hasil fraksinasi ekstrak etil asetat 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



aktivitas 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 perbanyakan 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. Hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun parrang romang (*Boehmeria virgata* Guillem) yaitu fraksi 1 dengan dosis 25 dan 17  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 2 dengan dosis 25 dan 17  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 3 dengan dosis 25; 17 dan 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , dan fraksi 4 dengan dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$  dapat meningkatkan jumlah leukosit total pada hari ke-4 setelah perlakuan dengan presentase kenaikan berturut-turut sebesar 47,97%; 89,65%; 74,26%; 80,87%; 98,85%; 100,99%; 68% dan 87%.
2. Fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi adalah fraksi 3 dengan dosis 17  $\mu\text{g/gBB}$  mencit (100,96%) yang berbeda sangat nyata dengan kontrol positif (58,25%).

#### V.2 Saran

Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut dari hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun parrang romang yang dapat meningkatkan jumlah leukosit total.

## DAFTAR PUSTAKA

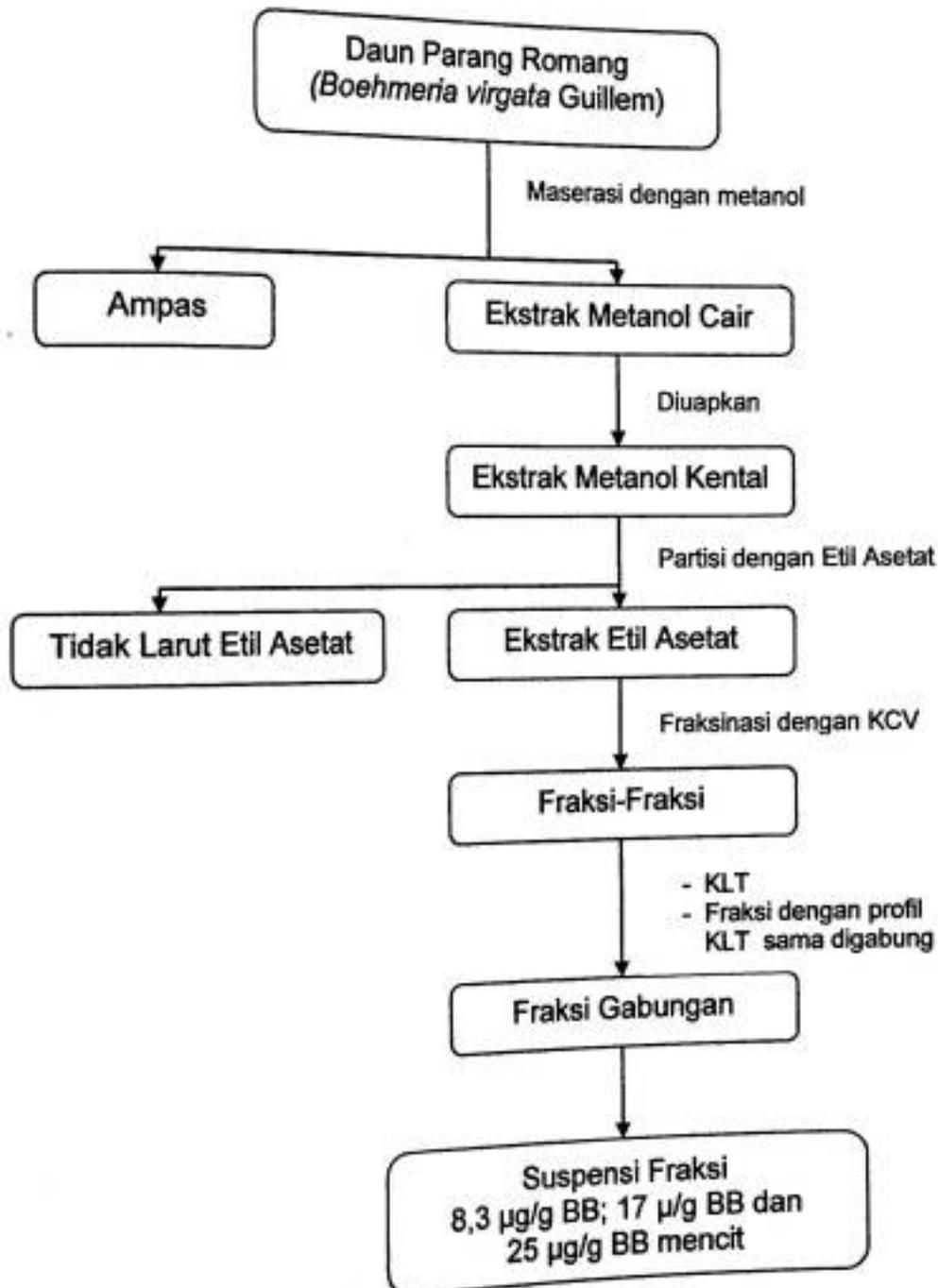
1. Price SA. Wilson LM. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyebaran Penyakit*. Ed. 6. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2005. hal. 268-270.
2. Lesson CR. Lesson TS. Paparo AA. *Buku Ajar Histologi*. Ed. 4. 1990. Terjemahan oleh Jan Tambayong. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; Jakarta; 1996. hal. 161-165
3. Sukardja IDG. *Onkologi Klinik*. Edisi II. Airlangga University Press. Surabaya. 2000. hal. 261-66.
4. 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](http://www.kalbe.co.id/files/cdk/16_imunologi_kanker.pdf/16_imunologi_kanker.html)
5. Baratawidjaja KG. *Imunologi Dasar*. Ed. 6. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2004. hal. 14, 48-50, 58, 66, 363-373, 412.
6. Abbas AK. Litchman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5<sup>th</sup> ed. Elseiver Saunders. Philadelphia. 2005. hal. 391-410.
7. Manggau M. Yusriadi. Mufidah. Alam G. Efek Antiproliferasi Ekstrak Daun Parrang Romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) terhadap Sel Kanker HeLa. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 2007. Vol 11 No. 3. hal. 75-79.
8. Manggau M. Mufidah. Lindequist U. Antiproliferation Againsts Human Bladder Cancer 5637 Cell Line and Antioxidant Activity of Various Plant Extracts. *J. Bahan Alam Indonesia*. Januari 2009. Vol 6 No. 6. hal. 247-250.
9. Manggau, M., Mufidah, Rafi, Z., Pakki, E. *The Administration of Ethylacetate Extract Parrang Romang Leaves (Boehmeria virgata (Forst) Guill) Intraperitoneally Could Enhance The Immune Response in Mice (Mus musculus)*. Makalah disajikan dalam IOCD International Symposium of Indonesian Medicinal Plants XXXI. Surabaya. 2007.
10. Brink M. Escobin RP. *Plant Resources of South-East Asia*. Fibre Plants. Backhuys Publishers. Leiden. 2003. hal. 86-91

11. Tjitrosoepomo G. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 2004. hal. 111
12. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Ed. 3. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 9
13. Harbone JB. *Metode Fitokimia*. 1984 Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung; Penerbit ITB; 1996. hal. 6-9
14. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Sediaan Galenik*. Ed. 2. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 10
15. Sastrohamidjoho H. *Kromatografi*. Penerbit Liberty. Yogyakarta. 2007.
16. Stahl E. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopis*. 1973. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung; Penerbit ITB; 1985. hal. 3-4.
17. Houghton PJ. Raman A. *Laboratory Handbook for The Fractionation Of Natural Extracts*. Chapman & Hall. London.
18. 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
19. 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.
20. 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
21. Guyton AC. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit*. Terjemahan oleh Petrus Andriato. Jakarta; Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1987. hal. 59
22. Cormack DH. *Ham Histologi*. 1992. Terjemahan oleh Jan Tambayong. Jakarta; Binarupa Aksara; 1994. hal. 258-260
23. 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](http://www.kalbe.co.id/cdk/files/cdk_030_diagnosis_laboratorium.pdf)

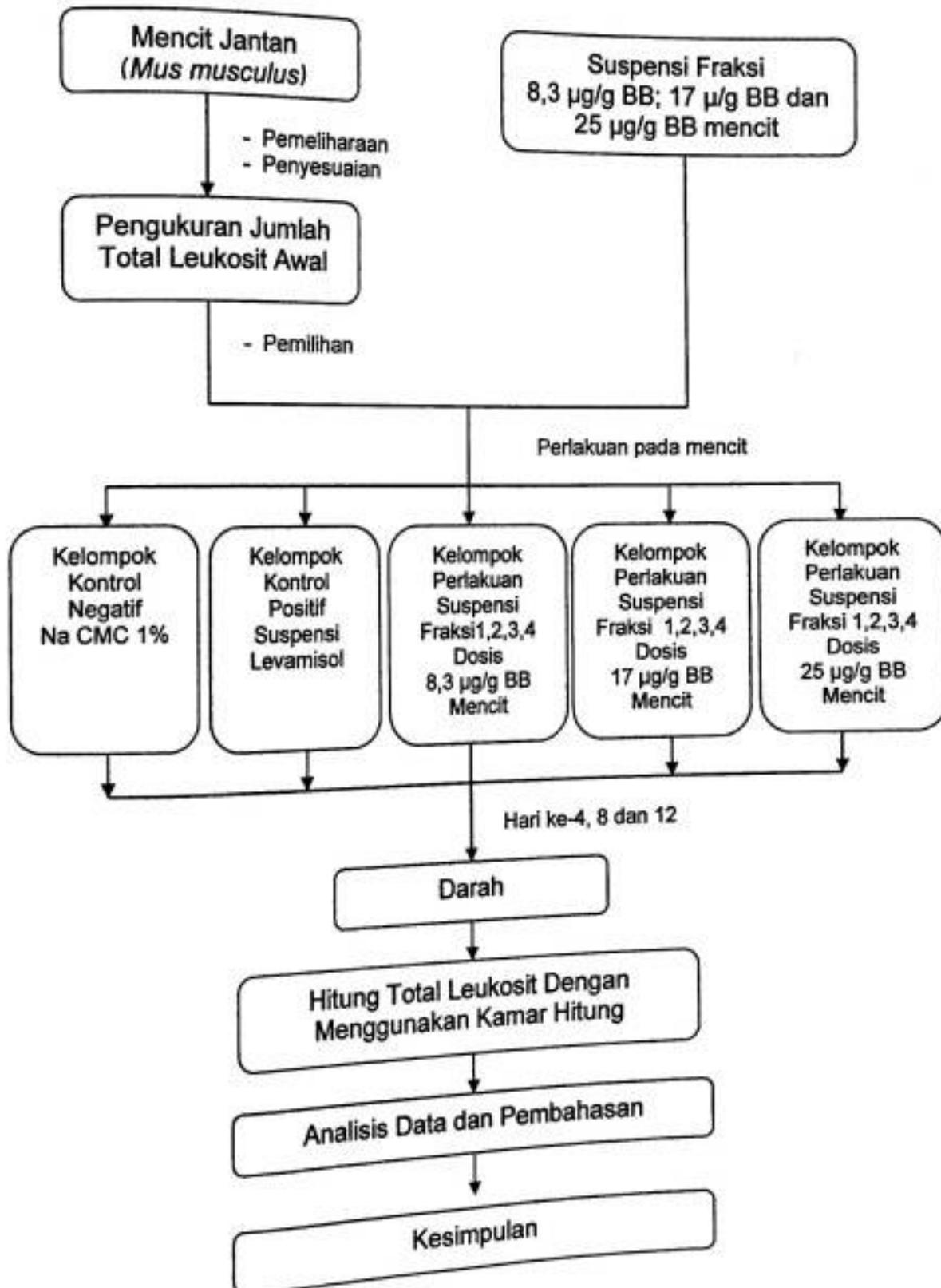
24. Gandasoebrata R. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Dian Rakyat. Jakarta. 2006. hal. 15-18
25. Irawan R. Silman E. *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Sedehana*. Ed. 2. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 1996. hal. 12-18
26. Adnan M. *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Makanan*. Penerbit Andi. Yogyakarta. 1997. hal. 5
27. 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.
28. 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

## Lampiran I

Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Parrang Romang  
(*Boehmeria virgata* Guillem).

## Lampiran II

## Skema Kerja Pengujian Efek Peningkatan Aktifitas Leukosit



## Lampiran III

Data Biologis Mencit (*Mus musculus*) (28)

Lama hidup	1 – 2 tahun, dapat sampai 3 tahun
Masa tumbuh	6 bulan
Suhu tubuh (°C)	37,9 – 39,2
Pubertas	6 minggu
Kecepatan respirasi per menit	91 - 216
Konsumsi makanan harian (g)	3 - 5
Konsumsi minuman Harian (ml)	5 - 8
Tekanan darah	130 – 160 sistol, 102 – 110 diastol
Volume darah	75 – 80 ml/kg ( 7,5 % BB)
Sel Darah Putih	6 – 15 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
Neutrofil	10 – 40 %
Limfosit	55 – 95 %
Eosinofil	0 – 4 %
Monosit	0,1 – 3,5 %
Basofil	0 – 0,3 %

## Lampiran IV

## Perhitungan Konversi Dosis dan Pembuatan Suspensi Levamisol

Dosis Levamisol : 2,5 mg/kg BB

Faktor Konversi manusia (70 kg) ke mencit (20 g) = 0,0026

Dosis mencit :  $2,5 \text{ mg/kg} \times 70 \text{ kg} \times 0,0026 = 0,455 \text{ mg}$

Untuk mencit 30 g :  $\frac{30 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 0,455 \text{ mg} = 0,6825 \text{ mg}$

Volume pemberian : 1 ml

Untuk 100 ml suspensi :  $\frac{100 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times 0,6825 \text{ mg} = 68,25 \text{ mg}$

Tersedia tablet Askamex<sup>®</sup> yang mengandung levamisol 25 mg/tablet.

Berat 20 tablet : 6,8994 g

Berat rata-rata 1 tablet : 0,34497 g (344,97 mg)

Berat yang diperlukan : 68,25 mg

Yang ditimbang :  $\frac{68,25 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} \times 344,97 \text{ mg} = 941,77 \text{ mg}$

Jadi, sebanyak 941,77 mg serbuk tablet Askamex<sup>®</sup> (yang setara dengan 68,25 mg levamisol) ditimbang dan disuspensikan dengan larutan koloidal Na CMC 1% sampai 100 ml.

## Lampiran V

## Perhitungan Dosis dan Pembuatan Suspensi Fraksi

A. Dosis 8,3  $\mu\text{g/g}$  BB mencit

$$\begin{aligned}\text{Untuk mencit 30 gram} &: 30 \text{ g} \times 8,3 \mu\text{g/g BB} = 249 \mu\text{g} \\ &= 0,249 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\text{Volume pemberian} : 1 \text{ ml}$$

$$\text{Untuk suspensi 100 ml} : \frac{100\text{ml}}{1\text{ml}} \times 0,249\text{mg} = 24,9\text{mg} (0,0249 \%b/v)$$

B. Dosis 17  $\mu\text{g/g}$  BB mencit

$$\begin{aligned}\text{Untuk mencit 30 gram} &: 30 \text{ g} \times 17 \mu\text{g/g BB} = 510 \mu\text{g} \\ &= 0,510 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\text{Volume pemberian} : 1 \text{ ml}$$

$$\text{Untuk suspensi 100 ml} : \frac{100\text{ml}}{1\text{ml}} \times 0,510\text{mg} = 51\text{mg} (0,051 \%b/v)$$

C. Dosis 25  $\mu\text{g/g}$  BB mencit

$$\begin{aligned}\text{Untuk mencit 30 gram} &: 30 \text{ g} \times 25 \mu\text{g/g BB} = 750 \mu\text{g} \\ &= 0,750 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\text{Volume pemberian} : 1 \text{ ml}$$

$$\text{Untuk suspensi 100 ml} : \frac{100\text{ml}}{1\text{ml}} \times 0,750\text{mg} = 75\text{mg} (0,075 \%b/v)$$

Lampiran VI  
Perhitungan Rendamen

$$\text{Rendamen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh (gram)}}{\text{Berat sampel (gram)}} \times 100\%$$

Berat ekstrak yang diperoleh adalah 60 g, dan berat sampel yang ditimbang adalah 500 mg, maka :

$$\text{Rendamen} = \frac{60\text{g}}{500\text{g}} \times 100\% = 12\%$$

## Lampiran VII

Analisis Statistika Data Hasil Perhitungan Jumlah Leukosit Total  
Menggunakan Rancangan Faktorial

Tabel 3. Data hasil perhitungan jumlah leukosit total.

Sediaan Uji	Hari ke-	Replikasi			Total	Rata-Rata
		I	II	III		
Kontrol Positif	0	7600	6200	6800	20600	6866.667
	4	11400	10200	11000	32600	10866.67
	8	9800	8600	8000	26400	8800
	12	8400	8000	6400	22800	7600
Sub Total		37200	33000	32200	102400	8533.333
Kontrol Negatif	0	6300	6900	6000	19200	6400
	4	6750	6900	5850	19500	6500
	8	8550	6300	6000	20850	6950
	12	8550	6450	7050	22050	7350
Sub Total		30150	26550	24900	81600	6800
Fraksi 1; 25 µg/gBB	0	6000	7950	7000	20950	6983.333
	4	8800	11200	11000	31000	10333.33
	8	7000	8600	9300	24900	8300
	12	6450	8300	8700	23450	7816.667
Sub Total		28250	36050	36000	100300	8358.333
Fraksi 1; 17 µg/gBB	0	6000	5200	6200	17400	5800
	4	11000	11600	10400	33000	11000
	8	7400	10400	9600	27400	9133.333
	12	7000	6400	6600	20000	6666.667
Sub Total		31400	33600	32800	97800	8150
Fraksi 1; 8,3 µg/gBB	0	5800	5200	6200	17200	5733.333
	4	8000	9150	9000	26150	8716.667
	8	7900	8100	7400	23400	7800
	12	6600	7350	6750	20700	6900
Sub Total		28300	29800	29350	87450	7287.5
Fraksi 2; 25 µg/gBB	0	5000	5850	7400	18250	6083.333
	4	13200	8800	9800	31800	10600
	8	10800	8600	8000	27400	9133.333
	12	8800	5950	7600	22350	7450
Sub Total		37800	29200	32800	99800	8316.667
Fraksi 2; 17 µg/gBB	0	5600	6000	5400	17000	5666.667
	4	10000	9350	11400	30750	10250
	8	7600	7200	9600	24400	8133.333
	12	6800	6400	8000	21200	7066.667
Sub Total		30000	28950	34400	93350	7779.167
Fraksi 2; 8,3 µg/gBB	0	5850	5200	6150	17200	5733.333
	4	8550	9600	8700	26850	8950
	8	7050	8200	7800	23050	7683.333
	12	6300	7050	7200	20550	6850
Sub Total		27750	30050	29850	87650	7304.167



Tabel 3. Data hasil perhitungan jumlah leukosit total (lanjutan).

Sediaan Uji	Hari ke-	Replikasi			Total	Rata Rata
		I	II	III		
Fraksi 3; 25 µg/gBB	0	7900	7200	5200	20300	6766.667
	4	13000	11800	9600	34400	11466.67
	8	12200	9500	7800	29500	9833.333
	12	10200	7600	5400	23200	7733.333
Sub Total		43300	36100	28000	107400	8950
Fraksi 3; 17 µg/gBB	0	6600	6800	7000	20400	6800
	4	15200	14200	11600	41000	13666.67
	8	11200	12400	9800	33400	11133.33
	12	10000	9000	7800	26800	8933.333
Sub Total		43000	42400	36200	121600	10133.33
Fraksi 3; 8,3 µg/gBB	0	6000	6000	6750	18750	6250
	4	9000	10800	11700	31500	10500
	8	8200	8800	8800	25800	8600
	12	7200	6200	7600	21000	7000
Sub Total		30400	31800	34850	97050	8087.5
Fraksi 4; 25 µg/gBB	0	5700	5700	6000	17400	5800
	4	10800	10950	10800	32550	10850
	8	7350	8250	8000	23600	7866.667
	12	6900	6750	7000	20650	6883.333
Sub Total		30750	31650	31800	94200	7850
Fraksi 4; 17 µg/gBB	0	5700	5000	7000	17700	5900
	4	8100	9200	9800	27100	9033.333
	8	6600	6200	8600	21400	7133.333
	12	5800	5800	7800	19400	6466.667
Sub Total		26200	26200	33200	85600	7133.333
Fraksi 4; 8,3 µg/gBB	0	5400	6400	6600	18400	6133.333
	4	9000	9800	8850	27650	9216.667
	8	8600	7900	7200	23700	7900
	12	7400	7200	6750	21350	7116.667
Sub Total		30400	31300	29400	91100	7591.667
Total		454900	446650	445750	1347300	8019.643

Analisis jumlah kuadrat :

$$1. \text{ FK} = \frac{1347300^2}{3 \times 14 \times 4} = 10804864820$$

$$2. \text{ JK Total} = (7600^2 + 11400^2 + \dots + 6750^2) - \text{FK} \\ = 660740180$$

$$3. \text{ JK Kelompok} = \frac{(454900^2 + 446650^2 + 445750^2)}{14 \times 4} - \text{FK} \\ = 908305$$

$$4. \text{ JK Kombinasi Perlakuan} = \frac{(20600^2 + 32600^2 + \dots + 21350^2)}{3} - \text{FK}$$

$$= 535038513,3$$

$$5. \text{ JK Galat} = \text{JK Total} - \text{JK Kelompok} - \text{JK Kombinasi Perlakuan}$$

$$= 660740180 - 908305 - 535038,13$$

$$= 124793361,7$$

$$6. \text{ JK Sediaan Uji} = \frac{(102400^2 + 81600^2 + \dots + 91100^2)}{3 \times 4} - \text{FK}$$

$$= 112949346,7$$

$$7. \text{ JK Hari} = \frac{(260750^2 + 425850^2 + 355200^2 + 305500^2)}{3 \times 14} - \text{FK}$$

$$= 357898870,5$$

$$8. \text{ JK Interaksi} = \text{JK Kombinasi Perlakuan} - \text{JK Sediaan Uji} - \text{JK Hari}$$

$$= 535038513,3 - 112949346,7 - 357898870,5$$

$$= 64190296,1$$

9. Derajat Bebas (db)

a. db kelompok  $= 3 - 1 = 2$

b. db kombinasi perlakuan  $= 56 - 1 = 55$

- db sediaan uji  $= 14 - 1 = 13$

- db hari  $= 4 - 1 = 3$

- db interaksi  $= 55 - 13 - 3 = 39$

c. db galat  $= 167 - 2 - 55 = 110$

d. db total  $= (3 \times 14 \times 4) - 1 = 167$

Tabel 4. Hasil analisis sidik ragam pengaruh utama dan interaksi sediaan uji dan hari pengamatan terhadap jumlah leukosit total

Sumber Keragaman	db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel	
					5%	1%
Kelompok	2	908350,0	454152,500	0,4003 <sup>NS</sup>	3,09	4,82
Kombinasi perl.	55	535038513,3	9727972,969	5,5748 <sup>**</sup>	1,48	1,72
- sediaan uji	13	112949346,7	8688411,285	7,6585 <sup>**</sup>	1,85	2,36
- hari	3	357898870,5	119.299623,5	105,1575 <sup>**</sup>	2,70	3,98
- interaksi	39	64190296,1	1645905,028	1,4508 <sup>NS</sup>	1,51	1,79
Galat	110	124793361,7	1134485,106			
Total	167	660740180,0				

Keterangan : NS = tidak nyata

\*\* = sangat nyata

Kesimpulan :

Pemberian sediaan dan hari pengamatan berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah leukosit total mencit jantan, sedangkan interaksi sediaan uji dan hari pengamatan tidak berbeda nyata.

$$KK = \frac{\sqrt{KTG}}{\bar{y}} \times 100\%$$

$$KK = \frac{\sqrt{1134485,106}}{8019,643} \times 100\% = 13,28\%$$

Keterangan : karena nilai koefisien keragaman (KK) besar yakni 13,28 % maka akan dilanjutkan dengan analisis uji beda jarak nyata Duncan.

#### 1. Perbandingan keragaman sediaan uji

$$JNTD_{\alpha} = P_{\alpha(p.v)} \cdot S_{\bar{y}}$$

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{KTG}{r \times n}}$$

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{1134485,106}{3 \times 4}}$$

$$S_{\bar{y}} = 307,47$$

$$JNTD_{0,05} = P_{0,05(p.110)} \cdot 307,47$$

$$JNTD_{0,01} = P_{0,01(p.110)} \cdot 307,47$$

Tabel 5. Perbandingan rata-rata keragaman sediaan uji.

Sediaan Uji	Rata-rata	Beda nyata pada Jarak P =													
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	8533,333	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	6800	1733,33**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	8358,333	1588,33**	175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	8150	208,33	1350**	383,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E	7287,5	862,5	1070,83*	487,5	1245,83*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	8316,667	1029,17*	166,67	41,67	1516,67**	216,66	-	-	-	-	-	-	-	-	
G	7779,167	537,5	491,67	370,83	579,17	979,17*	754,17	-	-	-	-	-	-	-	
H	7304,167	475	1012,5	16,67	845,83	1054,17*	504,17	1228,17*	-	-	-	-	-	-	
I	8950	1645,83**	633,33	633,33	1682,5	800	591,67	2150**	416,67	-	-	-	-	-	
J	10133,33	1183,3**	2829,16**	1818,66**	1816,66**	2845,83**	1983,33**	1774,99**	3333,13**	1599,99**	-	-	-	-	
K	8087,5	2045,83**	862,5	783,33	308,33	229,17	800	62,5	270,83	1287,5*	445,83	-	-	-	
L	7850	237,5	2283,33**	1100*	545,83	70,83	486,67	562,5	300	508,33	1050*	683,33	-	-	
M	7133,333	716,67	954,17*	2999,99**	1816,67**	170,83	645,63	1183,33*	154,17	1016,67	1226*	333,33	1400**	-	
N	7591,667	458,33	258,33	485,83	2541,66**	1358,33**	287,5	187,5	752	304,17	558,33	766,67	791,67	941,67	
Partisipan	2,8	2,95	3,05	3,12	3,18	3,22	3,26	3,29	3,32	3,34	3,36	3,38	3,4	3,4	
JNTD $\mu_{\text{partisipan}}$ = P.Sy	860,916	907,036	937,7835	959,306	977,755	990,053	1002,352	1011,576	1020,8	1028,95	1033,099	1039,249	1045,396	1045,396	
JNTD $\sigma_{\text{partisipan}}$ = P.Sy	1140,714	1186,834	1223,731	1248,328	1263,702	1282,15	1294,449	1306,747	1319,046	1328,27	1337,495	1343,644	1348,719	1348,719	

Keterangan :

- A = Kontrol Positif  
 B = Kontrol Negatif  
 C = Fraksi 1; dosis 25 µg/g BB  
 D = Fraksi 1; dosis 17 µg/g BB  
 E = Fraksi 1; dosis 8,3 µg/g BB  
 F = Fraksi 2; dosis 25 µg/g BB  
 G = Fraksi 2; dosis 17 µg/g BB  
 H = Fraksi 2; dosis 8,3 µg/g BB  
 I = Fraksi 3; dosis 25 µg/g BB  
 J = Fraksi 3; dosis 17 µg/g BB  
 K = Fraksi 3; dosis 8,3 µg/g BB

- L = Fraksi 4; dosis 25 µg/g BB  
 M = Fraksi 4; dosis 17 µg/g BB  
 N = Fraksi 4; dosis 25 µg/g BB

**Kesimpulan :**

- Kontrol positif tidak berbeda nyata dengan fraksi 1 dosis 25; 17  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 2 dosis 25; 17  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 3 dosis 25; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , dan fraksi 4 dosis 25; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Kontrol negatif tidak berbeda nyata dengan fraksi 1 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 2 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dosis 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 1 dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 1 dosis 17  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 2 dosis 25; 17  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 3 dosis 25; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 1 dosis 17  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 1 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 2 dosis 25; 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 3 dosis 25; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dosis 25; 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 1 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 2 dosis 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 3 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dosis 25; 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 2 dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 2 dosis 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 3 dosis 25; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dosis 25; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 2 dosis 17  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 2 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ , fraksi 3 dosis 25; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dosis 25; 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .

- Fraksi 2 dosis 8,3 tidak berbeda nyata dengan fraksi 3 dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$  dan fraksi 4 dosis 25; 17; 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 3 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 4 dosis 25 dan 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 4 dosis 25  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 4 dosis 17 dan 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .
- Fraksi 4 dosis 17  $\mu\text{g/gBB}$  tidak berbeda nyata dengan fraksi 4 dosis 8,3  $\mu\text{g/gBB}$ .

## 2. Perbandingan keragaman hari

$$JNTD_{\alpha} = P_{\alpha(p.v)} \cdot S_y$$

$$S_y = \sqrt{\frac{KTG}{r \times m}}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{1134485,106}{3 \times 14}}$$

$$S_y = 164,35$$

$$JNTD_{0,05} = P_{0,05(p.110)} \cdot 164,35$$

$$JNTD_{0,01} = P_{0,01(p.110)} \cdot 164,35$$

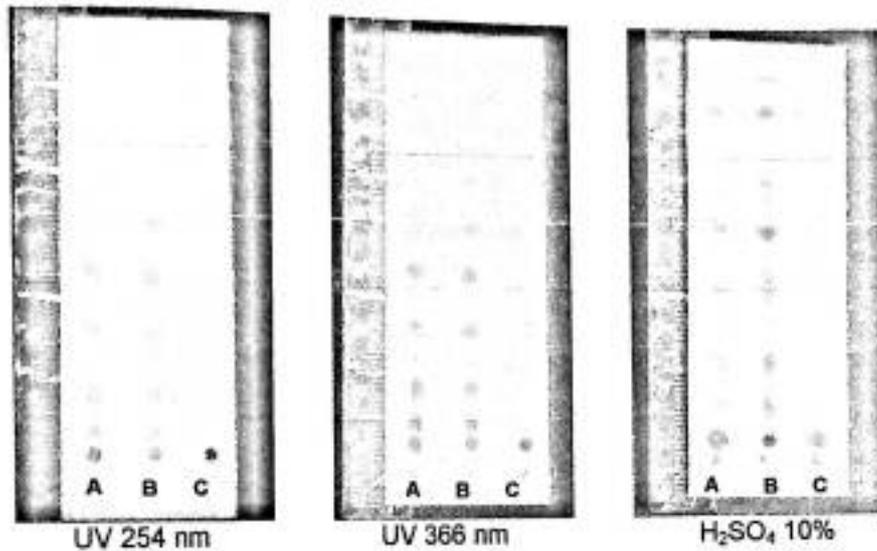
Tabel 6. Perbandingan rata-rata keragaman hari.

Hari ke-	Rata-rata	Beda nyata pada Jarak P =		
		2	3	4
0	6208.333	—	—	—
4	10139.29	3930.957**	—	—
8	8457.143	1682.147**	2248.81**	—
12	7272.81	1184.333**	2866.48**	1064.477**
		2.8	2.95	3.05
	$P_{0,05(p.110)}$	3.71	3.86	3.98
	$P_{0,01(p.110)}$			
	$JNTD_{0,05(p.110)} = P.Sy$	460.18	484.8325	501.2675
	$JNTD_{0,01(p.110)} = P.Sy$	609.7385	634.391	654.113

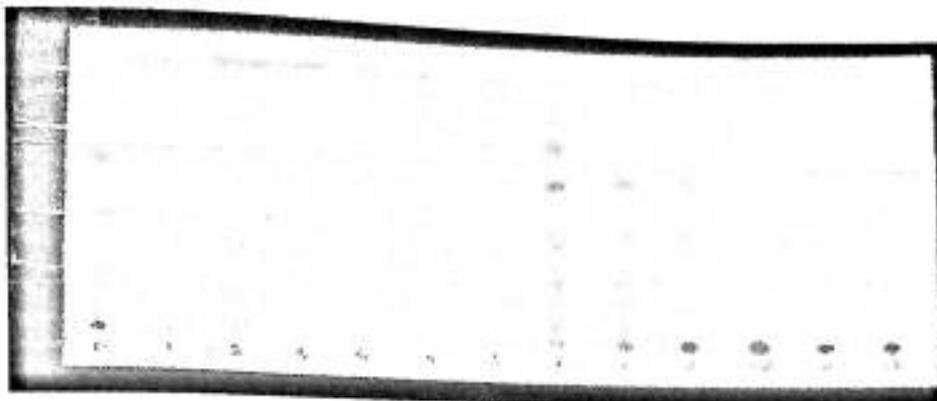
Keterangan : \*\* sangat berbeda nyata

## Lampiran VIII

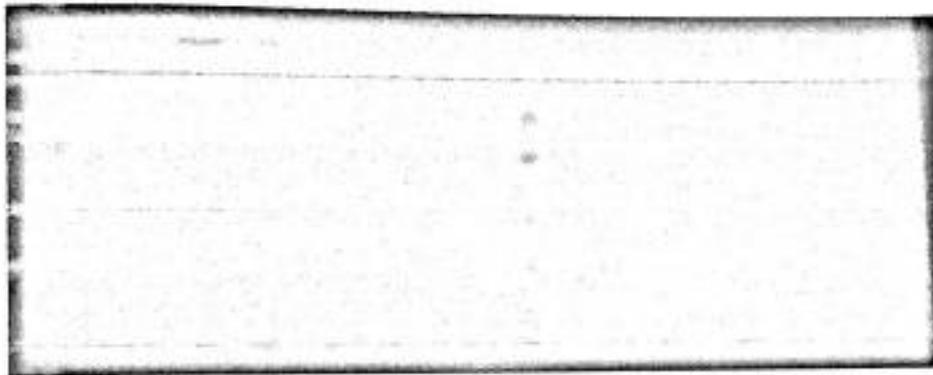
## Gambar-Gambar Pelaksanaan dan Hasil Penelitian



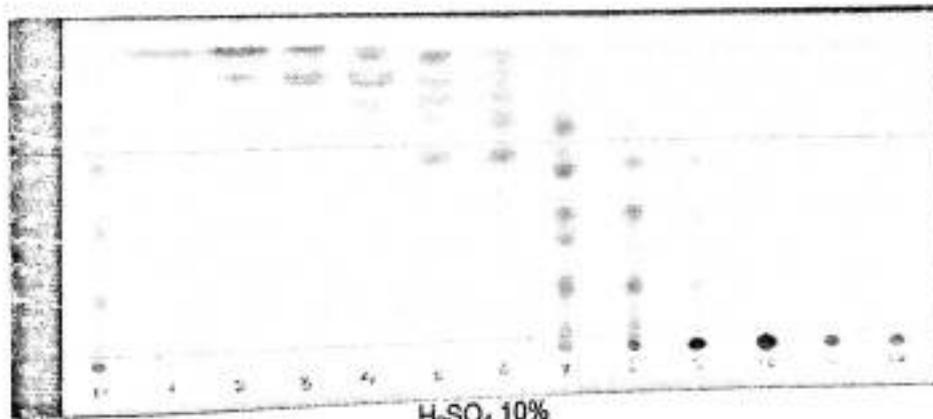
Gambar 7. Profil kromatografi lapis tipis ekstrak metanol awal, ekstrak etil asetat dan bagian tidak larut etil asetat. A = ekstrak metanol awal; B = ekstrak etil asetat; C = bagian tidak larut etil asetat. (Panjang lempeng 8 cm; lebar lempeng 3 cm; jarak elusi 6,5 cm; fase diam silika gel F 254; fase gerak heksan : etil asetat 3 : 1; penampak noda UV 254 nm, UV 366 nm dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%)



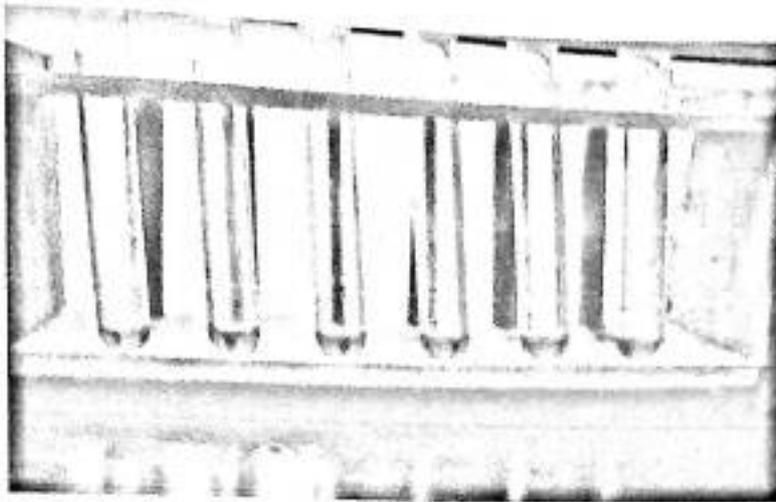
UV 254 nm



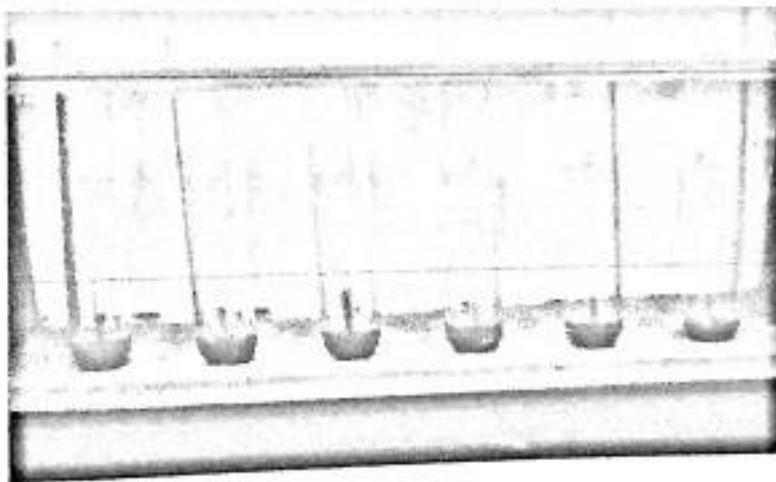
UV 366 nm

 $H_2SO_4$  10%

Gambar 8. Profil kromatografi lapis tipis hasil kromatografi cair vakum ekstrak etil asetat. (Panjang lempeng 8 cm; lebar lempeng 13 cm; jarak elusi 6,5 cm; fase diam silika gel F 254; fase gerak heksan : etil asetat 3 : 1; penampak noda UV 254 nm, UV 366 nm dan  $H_2SO_4$  10%)



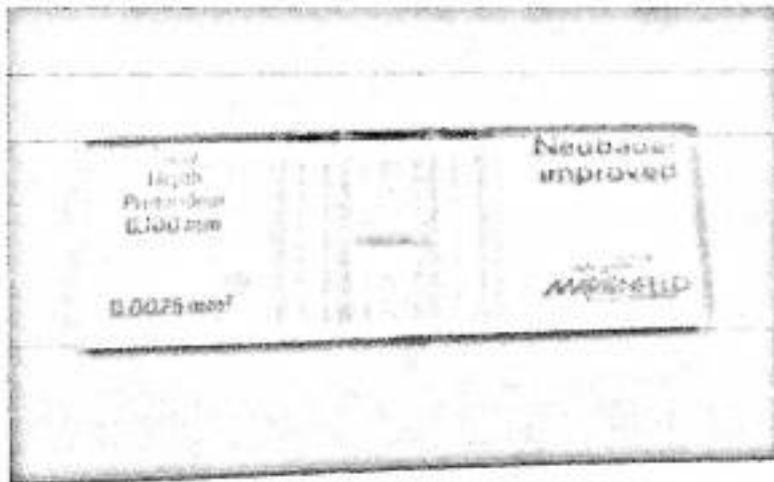
Gambar 9. Foto Larutan Turk



Gambar 10. Foto darah yang telah diencerkan dengan larutan Turk sebelum perhitungan jumlah leukosit total.



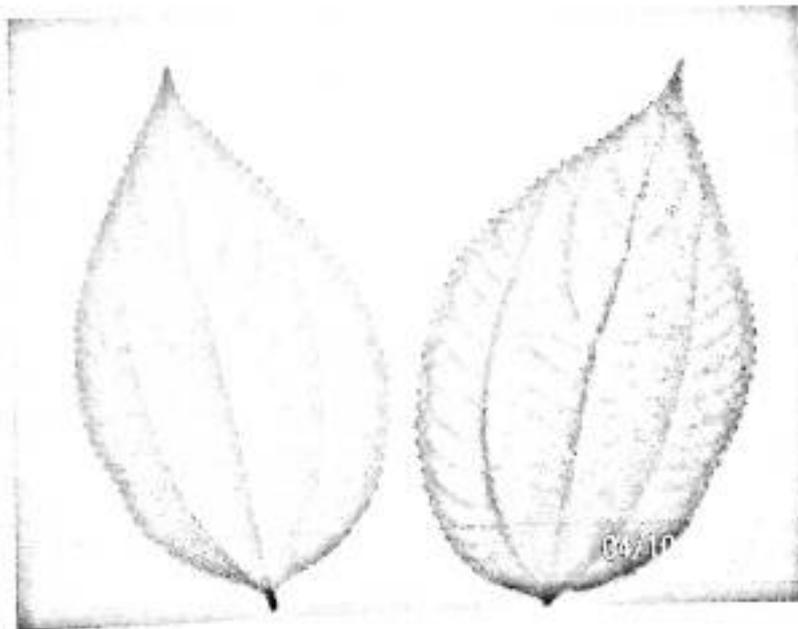
Gambar 11. Foto pengamatan jumlah leukosit total di bawah mikroskop.



Gambar 12. Foto kamar hitung Improved Neubaur



Gambar 13. Foto tanaman parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Gui il)



Gambar 14. Daun parrang romang



LIPI

**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
**( Indonesian Institute of Sciences )**  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
**( Research Center for Biology )**

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 9 Mei 2009

Nomor : 46/IIPII.1.02/If.8/V/2009  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
Bpk./Ibu/Sdr(i). Andre Yudhinata Sesa  
Jl. Arwana V Blok D-22  
Kompleks Sapiria Garden  
Makassar, Sulawesi Selatan

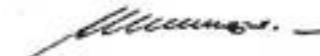
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Parrang Romang	<i>Boehmeria virgata</i> Guillem	Urticaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

  
Prof. Dr. Eko Baroto Walujo  
NIP. 195111041975011001