



**EFEK EKSTRAK ETANOL
HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness)
TERHADAP AKTIVITAS IMONOGLOBULIN
PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*)**

**FITRIANI ISKANDAR
N111 05 366**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

**EFEK EKSTRAK ETANOL
HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness)
TERHADAP AKTIVITAS IMONOGLOBULIN
PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*)**

SKRIPSI

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

**FITRIANI ISKANDAR
N111 05 366**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

PERSETUJUAN

EFEK EKSTRAK ETANOL HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness) TERHADAP AKTIVITAS IMONOGLOBULIN PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*)

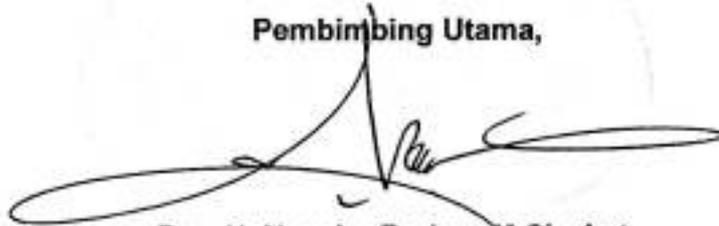
Oleh :

FITRIANI ISKANDAR

N111 05 366

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si., Apt.
NIP. 19470314 198003 1 001

Pembimbing Pertama,



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

Pembimbing Kedua,



Usmar, S.Si, M.Si, Apt.
NIP. 19710109 199702 1 001

Pada tanggal, 9 November 2010

PENGESAHAN

EFEK EKSTRAK ETANOL HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness) TERHADAP AKTIVITAS IMONOGLOBULIN PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*)

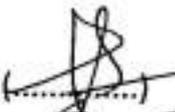
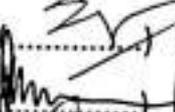
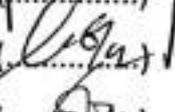
Oleh :

FITRIANI ISKANDAR

N111 05 366

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal : 9 November 2010

Panitia Penguji Skripsi :

1. Ketua : Subehan, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. 
2. Sekertaris : Dra. Ermina Pakki, M.Si., Apt. 
3. Anggota : Drs. H. Burhanuddin Taebe, M.Si., Apt. 
4. Anggota (Ex Officio) : Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si., Apt. 
5. Anggota (Ex Officio) : Mufidah, S.Si, M.Si., Apt.
6. Anggota (Ex Officio) : Usmar, S.Si., M.Si., Apt.

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin


Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 9 November 2010

Penyusun,



Fitriani Iskandar

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian efek ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) terhadap aktivitas imunoglobulin pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dengan maksud untuk mengetahui aktivitas imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin G (IgG) pada kelinci dengan menggunakan metode hemaglutinasi. Kelinci yang digunakan sebanyak 6 ekor yaitu tiga ekor untuk kontrol yang hanya diberi Na CMC dan tiga ekor yang lain diberi perlakuan dengan ekstrak etanol herba sambiloto dengan konsentrasi 0,37% b/v. Respon imun di induksi dengan menggunakan sel darah merah domba (SDMD) 2% v/v secara intraperitoneal sebanyak 10 ml/ekor. Setelah diinduksi, kelinci diberi ekstrak secara oral selama 5 hari berturut-turut. Pengamatan dilakukan pada hari keenam dan kesebelas dengan menggunakan metode hemaglutinasi titer antibodi yaitu pengenceran tertinggi serum darah kelinci yang masih menunjukkan aglutinasi. Berdasarkan hasil memperlihatkan bahwa ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) pada konsentrasi 0,37% b/v secara nyata dapat meningkatkan aktivitas imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin G (IgG) pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

ABSTRACT

A research about the effect of ethanol extract of andrographis herb (*Andrographis paniculata* Ness) on immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) activity in male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) has been conducted. The research was aimed to determine the effect of ethanol extract of andrographis herb (*Andrographis paniculata* Ness) on activity of immunoglobulin male rabbit using hemagglutination method. Six male rabbits were used, of which three rabbit as control that was given Na CMC only and the other three rabbits treated with ethanol extract of Andrographis herb (*Andrographis paniculata* Ness) in concentration of 0,37% b/v. Respect imun was induced by using Sheep Red Blood Cell (SRBC) 2% b/v intraperitoneally with 10 ml for each. After induced, male rabbit was given extract for 5 days respectively, with oral administration. The hemagglutination was conducted at the day 6th and 11th, using haemagglutinating antibody titter (HAT) method. The result of ethanol extract of andrographis herb (*Andrographis paniculata* Ness) with concentration 0,37% b/v significantly increased the imunoglobulin M (IgM) and imunoglobulin G (IgG) activity of male rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah *Subhanahu Wa ta'ala* karena kuasa-Nya sehingga skripsi ini bisa diselesaikan tepat pada waktunya.

Salawat dan salam penulis haturkan kepada Rasulullah Muhammad SAW. yang diutus oleh Allah SWT. Untuk menyempurnakan akhlak yang mulia pada seluruh umat manusia.

Dalam penyusunan skripsi ini, begitu banyak hal yang menghambat. Namun, semuanya itu semakin menambah semangat dalam mengerjakannya. Untuk itu, penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si., Apt. sebagai pembimbing utama, Ibu Mufidah, S.Si, M.Si, Apt. sebagai pembimbing pertama, dan Bapak Usmar, S.Si, M.Si., Apt. sebagai pembimbing kedua. Serta selaku penasehat akademik atas segala saran, kritik, waktu dan perhatian kepada yang diberikan kepada penulis. Tak lupa ucapan terima kasih penulis tujukan kepada Ibu Dekan, Bapak dan Ibu Dosen, Kepada Laboratorium Biofarmasi, Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Laboratorium Imunologi Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Makassar serta seluruh stafnya serta segenap karyawan pada program studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Ucapan terima kasih yang sangat besar pula penulis tujukan kepada seluruh keluarga yaitu Ayahanda Iskandar dan Ibunda Hj. Syamsuriah yang tanpa henti telah memberikan semangat, didikan, kasih sayang, dan doa yang tulus. Untuk adik-adikku serta suamiku Sudirman Latief yang sangat kusayangi dan keluarga yang lain.

Kakak-kakakku yang telah banyak membantu, memberikan pengarahan, dan meluangkan waktu untuk diskusi untuk memperlancar pelaksanaan penelitian ini : Sukamto, S.Si, Apt., Ismail, S.Si, Joe Maeda wati dan kakak yang lain. Rekan kerjaku Yuni Ekawati sebagai teman berbagi suka dan duka dalam melaksanakan penelitian, terima kasih atas waktu dan kerja samanya selama ini.

Kepada seluruh mahasiswa Fakultas Farmasi Unhas, terutama angkatan 2005 yang telah memberikan segala bentuk dukungan serta mengiringi langkah perjalanan panjang penulis dan menyelesaikan kuliah di Farmasi.

Penulis sangat menyadari bahwa begitu banyak kesalahan dan kekurangan yang ada. Permohonan maaf yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada semua pihak yang mungkin pernah dirugikan oleh penulis. Saran dan kritik sangat penulis harapkan untuk membangun ke arah yang lebih baik.

Makassar, 9 November 2010

Penulis

III.3 Pengujian Aktivitas IgM dan IgG pada Hewan Uji.....	25
III.4 Pengumpulan data	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
V.1 Hasil Penelitian	29
IV.2 Pembahasan	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	33
V.1 Kesimpulan	33
V.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Foto Data Titer Imunoglobulin Awal pada sumur mikro titrasi sebelum pemberian ekstrak	37
2. Foto hasil uji hemaglutinasi pada plat mikrotiter Untuk pengamatan aktivitas Imunoglobulin M (IgM)	38
3. Foto hasil uji hemaglutinasi pada plat mikrotiter untuk pengamatan aktivitas Imunoglobulin G (IgG)	39
4. Foto Domba sumber antigen	40
5. Foto Pada saat pengambilan antigen	40
6. Foto pengisian sumur mikro titrasi dengan PBS dan serum darah kelinci	40
7. Foto penambahan antigen (SDMD) ke dalam sumur yang sebelumnya telah diisi dengan PBS dan serum darah kelinci.....	41

BAB I

PENDAHULUAN

Berbagai polutan sebagai benda asing setiap saat masuk ke dalam tubuh sehingga menimbulkan reaksi dan penyakit lainnya, hal ini memicu terjadinya interaksi antara antigen dan antibodi yang terdapat dalam serum darah (1). Proses pertahanan tubuh berkaitan erat dengan antibodi. Antibodi adalah protein imunoglobulin yang disekresi oleh limfosit B (sel B) yang terfiksasi oleh antigen. Imunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi. Imonoglobulin M adalah kelas utama imunoglobulin yang pertama dibentuk atas rangsangan antigen. Respon IgM umumnya pendek yaitu berkisar 5 sampai 7 hari pertama setelah respon primer. Fenomena ini digunakan untuk menentukan apakah suatu injeksi yang diderita seseorang akut atau tidak (1,2,3).

Seiring dengan semakin berkembangnya penggunaan tanaman obat dalam dunia kesehatan, pengetahuan masyarakat terhadap khasiat dan Manfaat tanaman obat pun semakin berkembang. Salah satu tanaman obat tradisional yang biasa digunakan adalah sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dari suku Acanthaceae. Telah dilaporkan bahwa infus sambiloto dapat menurunkan kadar glukosa darah (4), ekstrak etanol pada dosis 135 dan 68 mg/kg berat badan mampu meningkatkan respon imun seluler pada hewan uji (5).

Permasalahannya ialah apakah herba sambiloto dapat meningkatkan aktivitas IgM dan IgG. Berdasarkan permasalahan tersebut, maka dilakukan penelitian uji efek ekstrak etanol herba sambiloto pada konsentrasi 0,37% terhadap aktivitas IgM dan IgG dengan metode hemaglutinasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol herba sambiloto terhadap aktifitas IgM dan IgG pada kelinci.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness)

II.1.1 Klasifikasi Tanaman

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Scrophulariales
Suku	: Acanthaceae
Marga	: <i>Andrographis</i>
Jenis	: <i>Andrographis paniculata</i> Ness (7)

II.1.2 Penamaan Tanaman

Sumatra	: Papaitan
Sunda	: Takila
Indonesia	: Sambiloto
Bugis	: Pai-pai
Enrekang	: Cambiroto (8)

II.1.3 Morfologi Tanaman

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) merupakan tumbuhan semusim. Tinggi tumbuhan sekitar 40-80 cm, dengan batang bersegi empat dan nodus yang membesar dan banyak bercabang. Daun tunggal

dengan letak berhadapan bersilang, bentuknya lanset dengan pangkal runcing dan ujung daun meruncing. Tepi daun merata, permukaan berwarna hijau tua dan permukaan bawah berwarna hijau muda. Panjang daun 2-8 cm, lebar 1-3 cm, bertangkai pendek. Bunga berwarna putih ungu keluar diujung batang atau ketiak daun, tersusun dalam rangkaian berupa tandan. Buah bentuknya memanjang sampai jorong dengan panjang sekitar 1,5 cm dan lebar 0,5 cm, menjadi 4 keping. Bijinya gepeng, kecil, berwarna coklat muda. Mudah diperbanyak dengan biji. Daun dan batang tumbuhan ini sangat pahit (9).

II.1.4 Tempat Tumbuh

Tanaman sering ditemukan tumbuh liar di tempat terbuka, seperti tepi jalan, ladang, atau tanah kosong yang terbengkalai, juga dipekarangan. Daerah penyebarannya dari dataran rendah sampai ketinggian 700 meter di atas permukaan laut (10).

II.1.5 Kandungan Kimia

Herba sambiloto mengandung lakton, flavonoid (andrographolid, neoandrographolid), minyak menguap dan mineral seperti kalium, kalsium, natrium dan asam kersik (8).

II.1.6 Kegunaan

Herba sambiloto banyak digunakan sebagai anti radang, anti infeksi, mencegah penggumpalan darah, anti racun, menurunkan glukosa dalam darah, menghancurkan inti sel kanker dan sebagainya (5).

II.2 Uraian Mengenai Ekstraksi Bahan Alami

II.2.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (12).

II.2.2 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan, dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif tersebut terdapat didalam sel, namun sel tanaman dan sel hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya.

Umumnya zat aktif yang terkandung dalam tanaman maupun hewan lebih larut dalam pelarut organik. Proses terekstraksinya zat aktif dalam tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan proses ini berulang terus sampai terjadinya keseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (11).

II.2.3 Pemilihan Pelarut

Pemilihan cairan penyari harus memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Murah dan mudah diperoleh.
2. Stabil secara fisika dan kimia.
3. Bereaksi netral, yaitu tidak mempengaruhi zat-zat berkhasiat.

4. Tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar.
5. Selektif, yaitu hanya menarik zat berkhasiat .

II.2.4 Metode 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 dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari.

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna.

Ada beberapa modifikasi dari maserasi, yaitu:

1. Digesti

Adalah cara maserasi dengan menggunakan pemanasan lemah, yaitu pada suhu 40° - 50° C. Cara ini hanya dapat dilakukan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan.

2. Maserasi dengan mesin pengaduk

Penggunaan mesin pengaduk yang berputar terus menerus, maka waktu proses maserasi dapat dipersingkat menjadi 6 – 24 jam.

3. Remaserasi

Cairan penyari dibagi menjadi dua. Seluruh serbuk simplisia dimaserasi dengan cairan penyari pertama, kemudian dienaptungkan

dan diperas. Ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari yang kedua.

4. Maserasi melingkar

Maserasi dapat diperbaiki dengan mengusahakan agar cairan penyari selalu bergerak dan menyebar. Dengan cara ini penyari selalu mengalir kembali secara berkesinambungan melalui serbuk simplisia dan melarutkan zat aktifnya. Cairan penyari dipompa dari bawah bejana penyari (12).

II.3 Uraian Sistem Pertahanan tubuh

II.3.1 Definisi

Imunitas adalah resistensi terhadap penyakit terutama penyakit infeksi. Gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi disebut sistem imun dan reaksi yang dikoordinasi sel-sel dan molekul-molekul terhadap mikroba dan bahan lainnya disebut respon imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup (1).

Respon imun sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenali molekul asing (antigen) yang terdapat pada patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan sumber antigen bersangkutan (3).

II.3.2 Klasifikasi Respon Imun

II.3.2.1 Respon Imun Nonspesifik (*natural/ innate/ native*)

Respon imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*), dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar pada zat tersebut (3). Disebut nonspesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Sistem tersebut merupakan pertahanan terdepan dan dapat memberikan respon langsung.

Komponen-komponen sistem imun nonspesifik terdiri atas :

A. Pertahanan fisik/mekanik

Dalam sistem pertahanan fisik atau mekanik, kulit, selaput lendir, silia saluran nafas, batuk dan bersin merupakan garis pertahanan terdepan terhadap infeksi. Keratinosit dan lapisan epidermis kulit sehat dan epitel mukosa yang utuh tidak dapat ditembus kebanyakan mikroba. Kulit yang rusak akibat luka bakar dan selaput lendir saluran napas yang rusak oleh asap rokok akan meningkatkan risiko infeksi.

B. Pertahanan biokimia

Kebanyakan mikroba tidak dapat menembus kulit yang sehat, namun beberapa dapat masuk tubuh melalui kelenjar sebaceous dan folikel rambut, pH asam keringat dan sekresi sebaceous, berbagai asam lemak yang dilepas kulit mempunyai efek denaturasi terhadap protein membran sel sehingga dapat mencegah infeksi yang terjadi melalui kulit.

Lisozim dalam keringat, ludah, air mata dan air susu ibu melindungi tubuh dari berbagai bakteri gram positif oleh karena dapat menghancurkan lapisan peptidoglikan dinding bakteri. Air susu ibu juga mengandung laktooksidase dan asam neuraminik yang mempunyai sifat antibakterial terhadap *Escherichia coli* dan stafilokokus.

Asam hidroklorida dalam lambung, enzim proteolitik, antibodi dan empedu dalam usus halus membantu menciptakan lingkungan yang dapat mencegah infeksi banyak mikroba. pH yang rendah dalam vagina, spermin dalam semen dan jaringan lain dapat mencegah tumbuhnya bakteri gram positif. Pembilasan oleh urin dapat mengeliminasi bakteri patogen.

Bahan yang disekresi mukosa saluran napas (enzim dan antibodi) dan telinga berperan pula dalam pertahanan tubuh secara biokimiawi. Mukus yang kental melindungi sel epitel mukosa, dapat menangkap bakteri dan bahan lainnya yang selanjutnya dikeluarkan oleh gerakan silia.

C. Pertahanan humoral

Berbagai bahan dalam sirkulasi seperti komplemen, interferon, CRP dan kolektin berperan dalam pertahanan humoral. Serum normal dapat membunuh dan menghancurkan beberapa bakteri gram negatif. Hal itu disebabkan oleh adanya kerja sama antara antibodi dan komplemen.

1) Komplemen

Komplemen terdiri atas sejumlah besar protein yang bila diaktifkan akan memberikan proteksi terhadap infeksi dan berperan dalam respon

inflamasi. Komplemen dapat diaktifkan secara langsung oleh mikroba atau produknya atau oleh antibodi. Antibodi dan komplemen dapat menghancurkan membran lapisan lipopolisakarida dinding sel. Komplemen berperan sebagai opsonin yang meningkatkan fagositosis, sebagai faktor kemotaktik dan juga menimbulkan destruksi/lisis bakteri dan parasit.

2) Interferon

Interferon adalah sitokin berupa glikoprotein yang diproduksi makrofag yang diaktifkan sel NK (*Natural Killer*) dan berbagai sel tubuh yang mengandung nukleus dan dilepas sebagai respons terhadap infeksi virus. IFN (interferon) mempunyai sifat antivirus dan dapat menginduksi sel-sel sekitar sel yang terinfeksi virus menjadi resisten terhadap virus.

3) Protein Fase Akut

Selama terjadi infeksi, produk bakteri seperti LPS (lipopolisakarida) mengaktifkan makrofag dan sel lain untuk melepas berbagai sitokin seperti IL-1 (Interleukin) yang merupakan pirogen endogen, TNF (Tumor Necrosis Factor) dan IL-6. Sitokin-sitokin tersebut merangsang hati untuk mensintesis dan melepas sejumlah protein plasma yang disebut protein fase akut seperti CRP (C-Reactive Protein), MBL (Mannan Binding Lectin). CRP termasuk golongan protein yang kadarnya dalam darah meningkat pada infeksi akut sebagai respon imunitas nonspesifik. MBL berperan mengaktifkan komplemen. Protein fase akut lain adalah α 1-antitripsin, amiloid serum A, haptoglobin dan fibrinogen, yang juga berperan pada peningkatan laju endap darah akibat infeksi. Secara keseluruhan, respon

fase akut memberikan efek menguntungkan melalui peningkatan resistensi pejamu, mengurangi cedera jaringan dan meningkatkan resolusi dan perbaikan cedera inflamasi.

4) Kolektin

Kolektin adalah protein yang berfungsi sebagai opsonin yang dapat mengikat hidrat arang pada permukaan kuman. Kompleks yang terbentuk diikat reseptor fagosit untuk dimakan. Selanjutnya komplemen juga diaktifkan.

D. Pertahanan selular

Fagosit, makrofag, dan sel *Natural Killer* (NK) berperan dalam sistem imun nonspesifik seluler.

1) Fagosit

Fagositosis yang efektif pada kuman dini akan dapat mencegah timbulnya infeksi. Supaya dapat terjadi fagositosis, sel-sel fagosit harus berada dalam jarak dekat dengan partikel bakteri, atau lebih tepat lagi bahwa partikel tersebut harus melekat pada permukaan fagosit. Untuk itu fagosit harus bergerak menuju sasaran yang dimungkinkan berkat dilepaskannya zat atau mediator tertentu yang disebut faktor leukotaktik atau kemotaktik yang berasal dari bakteri maupun yang dilepaskan oleh neutrofil atau makrofag yang sebelumnya telah berada di lokasi bakteri. Selanjutnya bakteri perlu mengalami opsonisasi, berarti bakteri terlebih dahulu dilapisi (opsonisasi) oleh imunoglobulin atau komplemen (C3b) agar lebih mudah ditangkap oleh fagosit. Selanjutnya bakteri masuk ke

dalam sel dengan cara endositosis dan terperangkap dalam kantung fagosom seolah-olah ditelan dan dihancurkan, baik dengan proses oksidasi-reduksi maupun oleh derajat keasaman yang ada dalam fagosit atau penghancuran oleh lisozim dan gangguan metabolisme bakteri.

2) Makrofag

Monosit ditemukan dalam sirkulasi, tetapi jumlah yang lebih sedikit dibanding neutrofil. Monosit bermigrasi ke jaringan dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag dapat hidup lama, mempunyai beberapa granula dan melepaskan berbagai bahan, antara lain lisozim, komplemen, interferon dan sitokin yang memberikan kontribusi dalam pertahanan spesifik dan nonspesifik.

3) Sel NK

Limfosit terdiri atas sel B, sel T dan sel NK. Jumlah sel NK sekitar 5-125% dari limfosit dalam sirkulasi dan 425% dari limfosit jaringan. Sel tersebut berfungsi dalam imunitas nonspesifik terhadap virus dan tumor.

4) Sel mast

Sel mast berperan dalam reaksi alergi dan juga dalam pertahanan pejamu, jumlahnya menurun pada sindrom imunodefisiensi. Sel mast juga berperan pada imunitas terhadap parasit dalam usus dan terhadap invasi bakteri (1)

II.3.2.2 Respon Imun Spesifik

Respon imun spesifik merupakan respon didapat (*acquired*) yang timbul terhadap antigen tertentu, dimana tubuh pernah terpapar

sebelumnya. Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali muncul dalam tubuh segera dikenal oleh sistem imun spesifik sehingga terjadi sensitasi sel-sel sistem imun tersebut. Benda asing yang sama, bila terpajan ulang akan dikenal lebih cepat, kemudian dihancurkan (1).

A. Sistem imun spesifik humoral

Limfosit B atau sel B mempunyai peranan penting dalam sistem imun spesifik humoral. Bila limfosit B dirangsang oleh antigen, sel tersebut akan berproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Antibodi yang dilepas dapat ditemukan dalam serum. Antibodi ini berikatan dengan antigen membentuk kompleks antigen-antibodi yang dapat mengaktivasi komplemen dan menyebabkan hancurnya antigen tersebut.

B. Sistem imun spesifik seluler

Banyak mikroorganisme yang hidup dan berkembang biak intra-seluler antara lain virus dan mikroba yang hidup dalam makrofag sehingga sulit dijangkau oleh antibodi. Untuk melawan mikroorganisme tersebut diperlukan respon imun seluler. Yang berperan dalam sistem imun spesifik seluler adalah limfosit T atau sel T. Limfosit T dibentuk didalam sum-sum tulang tetapi poliferasi dan diferensiasinya terjadi di dalam kelenjar timus.

C. Interaksi antara respon imun humoral dengan selular.

Interaksi ini disebut *Antibodi Dependent Cell Mediated Cytotoxicity* (ADCC) karena sitolisis baru terjadi bila dibantu oleh antibodi. Dalam hal ini antibodi berfungsi melapisi antigen sasaran, sehingga sel NK (*natural killer*) yang mempunyai reseptor terhadap fragmen Fc antibodi tersebut dapat melekat erat pada sel atau antigen sasaran. Perlekatan sel NK pada kompleks antigen-antibodi mengakibatkan sel NK dapat menghancurkan sel sasaran (3).

ii.4 Antigen

Antigen adalah suatu molekul yang terikat pada suatu struktur protein spesifik yang disebut antibodi. Istilah lain yang berkenaan dengan antigen adalah imunogen yakni suatu antigen yang mengaktifasi sel imun untuk memicu respon imun melawan dirinya sendiri (16). Secara sederhana antigen didefinisikan sebagai substansi yang ketika dimasukkan secara parenteral ke dalam seekor binatang dapat menyebabkan produksi antibodi dari binatang tersebut dan akan bereaksi secara spesifik dengan antibodi yang dihasilkan (19).

Istilah antigen sekarang digunakan untuk menyebut substansi yang mampu bereaksi dengan antibodi yang diproduksi atas rangsangan imunogen, tanpa mempertimbangkan apakah antigen itu sendiri bersifat imunogenik. Ini berarti bahwa semua imunogen adalah antigen, tetapi tidak semua antigen merupakan imunogen. Kita ketahui bahwa hampir semua molekul biologik, termasuk karbohidrat, lipid, hormon, protein, dan

asam nukleat dapat bertindak sebagai antigen, tetapi hanya makromolekul yang bersifat imunogenik dan mampu merangsang aktivasi limfosit yang diperlukan untuk mengawali respon imun. Substansi dengan berat molekul rendah, seperti berbagai jenis obat dan antibiotik, umumnya tidak imunogenik, tetapi bila diikat pada protein yang imunogenik (*carrier protein*) ia akan membentuk suatu kompleks yang dapat merangsang sistem imun untuk memproduksi antibodi terhadap molekul tersebut (3).

II.5 Antibodi

II.5.1 Immunoglobulin

Bila darah dibiarkan membeku akan meninggalkan serum yang mengandung berbagai bahan larut tanpa sel. Bahan tersebut mengandung molekul antibodi yang digolongkan dalam protein yang disebut sebagai globulin dan sekarang dikenal sebagai immunoglobulin. Dua cirinya yang penting ialah spesifitas dan aktivitas biologik (1).

Antibodi atau Immunoglobulin (Ig) adalah golongan protein yang dibentuk sel plasma (proliferasi sel B) akibat kontak dengan antigen. Antibodi mengikat antigen yang menimbulkannya secara spesifik. Bila serum protein tersebut dipisahkan secara elektroforesis, Ig ditemukan terbanyak dalam fraksi globulin gama meskipun ada beberapa yang ditemukan juga dalam fraksi globulin α dan β (24).

II.5.2 Struktur Immunoglobulin

Struktur dasar immunoglobulin terdiri atas 2 rantai berat (H-chain) yang identik dan 2 rantai ringan (L-chain) yang juga identik. Setiap rantai

ringan terikat pada rantai berat melalui ikatan disulfida (S-S), demikian pula rantai berat satu dengan yang lain diikat dengan ikatan S-S. Ada 2 jenis rantai ringan (*kappa* dan *lambda*) yang terdiri atas 230 asam amino serta 5 jenis rantai berat yang tergantung pada kelima jenis imunoglobulin. Rantai berat terdiri atas 450-600 asam amino, sehingga berat dan panjang rantai berat tersebut adalah dua kali rantai ringan.

Molekul ini oleh enzim proteolitik papain dapat dipecah menjadi 3 fragmen yaitu 2 fragmen yang mempunyai susunan sama terdiri atas rantai berat (H) dan rantai ringan (L) disebut fragmen *Fab* yang dibentuk oleh domain terminal-N dan 1 fragmen yang hanya terdiri atas rantai berat saja disebut fragmen *Fc* yang dibentuk oleh domain terminal-C. Fragmen *Fab* dengan antigen *binding site* berfungsi mengikat antigen. Karena itu susunan asam amino dibagian ini berbeda antara molekul imunoglobulin satu dengan yang lain dan sangat variabel sesuai dengan variabilitas antigen yang merangsang pembentukannya. Fragmen *Fc* tidak mempunyai kemampuan mengikat antigen tetapi dapat bersifat sebagai antigen (determinan antigen) dan menentukan sifat biologi imunoglobulin bersangkutan (16).

II.5.3 Fungsi Imunoglobulin

Imunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi. Antibodi yang disekresikan dapat berfungsi sebagai adaptor yang mengikat antigen melalui *binding-sites-*

nya yang spesifik, sekaligus merupakan jembatan yang menghubungkan antigen dengan sel-sel sistem imun atau mengaktivasi komplemen.

Pada beberapa keadaan, antibodi melaksanakan fungsi proteksinya dengan menetralkan antigen secara langsung dengan interaksi antigen-antibodi, tetapi yang lebih sering adalah bahwa dalam melaksanakan fungsinya ia dibantu oleh sistem efektor lain, misalnya komplemen, fagosit dan sel T-sitotoksik (3).

II.5.4 Klasifikasi imunoglobulin

Ada lima kelas dari imunoglobulin manusia yang diketahui yaitu IgG, IgM, IgA, IgD dan IgE. IgG merupakan imunoglobulin utama yang dibentuk atas rangsangan antigen. IgG adalah satu-satunya imunoglobulin yang dapat melewati plasenta. IgM sebuah makroglobulin yang memiliki berat molekul terbesar dibandingkan kelas imunoglobulin yang lain. IgM merupakan tipe imunoglobulin yang paling banyak dan seringkali tidak eksklusif, disekresi selama respon primer antibodi. IgA adalah imunoglobulin yang banyak ditemukan dalam cairan sekret oleh karena itu sering disebut sebagai imunoglobulin sekretoris. IgD adalah imunoglobulin yang ditemukan dalam jumlah sangat sedikit. Peran biologiknya sebagai antibodi dalam reaksi hipersensitifitas terhadap penisilin (3).

II.6 Imunoglobulin M (IgM)

II.6.1 Sifat Fisikokimia

Konsentrasi normal dari Imunoglobulin M (IgM) pada manusia dewasa adalah 0,04 sampai 0,15 g per 100 ml dan itu merupakan 0,5

sampai 1,9 % dari total protein serum. Seringkali ditemukan pada ekstrasvaskular. Rata-rata dihasilkan sekitar 0,4 mg per hari (untuk berat badan 70 kg) dan waktu paruh ($t_{1/2}$) sekitar 5 hari. Mengandung karbohidrat sekitar 5 sampai 10%. IgM mempunyai berat molekul sekitar 900.000 dalton (koefisien sedimentasi 19S), ditemukan dalam jumlah kecil dalam bentuk dimer dan (bahkan dalam jumlah yang sangat kecil) trimer. Hal yang penting dari IgM manusia yaitu kelas dari euglobulinnya yang tidak larut pada konsentrasi garam yang rendah pada pH dekat titik isoelektriknya (pada kasus ini IgM pada pH 5,5 sampai 6,0) (18).

II.6.2 Struktur dan sifat

Molekul IgM merupakan polimer lima sub unit yang masing-masing terdiri dari empat peptida, masing-masing subunit membawa domain C_H ekstra. IgM merupakan imunoglobulin yang berukuran paling besar. Karena ukuran yang besar ini, IgM terutama terdapat dalam intravaskular. Dilihat dari mikroskop elektron, IgM berbentuk seperti bintang, tetapi bila ia melekat pada antigen, bagian *Fab* akan melekat pada permukaan antigen sehingga bentuk molekul tampak seperti kepiting (17).

II.6.3 Aktivitas biologi dan imunologi

Imunoglobulin M tidak melewati plasenta, mengaktifkan komplemen tetapi bukan faktor penyebab rheumatik berbeda dengan IgG. IgM seperti IgG dan imunoglobulin yang mengopsonisasi. IgM adalah tipe antibodi yang sangat efisien dalam mengaglutinasi. IgM dapat menyebabkan aglutinasi berbagai partikel dan fiksasi komplemen dengan efisiensi yang

sampai 1,9 % dari total protein serum. Seringkali ditemukan pada ekstrasvaskular. Rata-rata dihasilkan sekitar 0,4 mg per hari (untuk berat badan 70 kg) dan waktu paruh ($t_{1/2}$) sekitar 5 hari. Mengandung karbohidrat sekitar 5 sampai 10%. IgM mempunyai berat molekul sekitar 900.000 dalton (koefisien sedimentasi 19S), ditemukan dalam jumlah kecil dalam bentuk dimer dan (bahkan dalam jumlah yang sangat kecil) trimer. Hal yang penting dari IgM manusia yaitu kelas dari euglobulinnya yang tidak larut pada konsentrasi garam yang rendah pada pH dekat titik isoelektriknya (pada kasus ini IgM pada pH 5,5 sampai 6,0) (18).

II.6.2 Struktur dan sifat

Molekul IgM merupakan polimer lima sub unit yang masing-masing terdiri dari empat peptida, masing-masing subunit membawa domain C_H ekstra. IgM merupakan imunoglobulin yang berukuran paling besar. Karena ukuran yang besar ini, IgM terutama terdapat dalam intravaskular. Dilihat dari mikroskop elektron, IgM berbentuk seperti bintang, tetapi bila ia melekat pada antigen, bagian *Fab* akan melekat pada permukaan antigen sehingga bentuk molekul tampak seperti kepiting (17).

II.6.3 Aktivitas biologi dan imunologi

Imunoglobulin M tidak melewati plasenta, mengaktifkan komplemen tetapi bukan faktor penyebab rheumatik berbeda dengan IgG. IgM seperti IgG dan imunoglobulin yang mengopsonisasi. IgM adalah tipe antibodi yang sangat efisien dalam mengaglutinasi. IgM dapat menyebabkan aglutinasi berbagai partikel dan fiksasi komplemen dengan efisiensi yang

sangat tinggi yaitu 20 kali lebih efektif dalam aglutinasi dan 1000 kali lebih efektif dalam aktivitas penghancuran bakteri dibanding IgG. Antibodi IgM cenderung menunjukkan afinitas rendah terhadap antigen dengan determinan tunggal (hapten) karena molekul IgM multivalen, molekul IgM dapat menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap antigen yang mempunyai banyak epitop (18).

II.7 Immunoglobulin G (IgG)

II.7.1 Sifat Fisikokimia

IgG adalah immunoglobulin utama pada serum manusia yang meliputi 70-725% dari seluruh immunoglobulin. IgG normalnya terdapat dalam serum orang dewasa pada konsentrasi 1,0 sampai 1,4 gram per 100 ml, dan itu berarti 12 sampai 18 persen dari total protein serum. IgG juga didistribusikan secara ekstravaskular (sekitar 50%). Rata-rata dihasilkan sekitar 2,3 gram per hari (untuk berat badan sekitar 70 kg) dan waktu paruh ($t_{1/2}$) sekitar 23 hari. Kandungan karbohidrat dari IgG sangat rendah: 2,5%. Berat molekul dari IgG sekitar 160.000 dalton dan koefisien sedimentasinya sekitar 7 S (7 Svedbergs) (18).

II.7.2 Struktur dan sifat

Setiap molekul IgG terdiri dari 2 rantai L dan dua rantai H yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Karena mempunyai 2 tempat pengikatan yang identik, immunoglobulin ini bersifat divalen. Berdasarkan perbedaan antigenik rantai H dan pada jumlah dan lokasi ikatan disulfida, ada empat sub kelas IgG, yaitu IgG1, IgG2, IgG3, dan IgG4. Sebagian

besar IgG adalah IgG1 (625%). Antibodi IgG2 ditujukan pada antigen polisakarida yang merupakan bagian sistem pertahanan penting terhadap bakteri berkapsul.

IgG merupakan antibodi terpenting pada respon imun sekunder dan juga merupakan antibodi penting untuk pertahanan terhadap bakteri dan virus. IgG adalah satu-satunya antibodi yang melewati plasenta. Antibodi ini memberikan imunitas pasif yang tinggi pada bayi baru lahir (17).

II.7.3 Aktivitas biologi dan imunologi

Diantara semua kelas imunoglobulin, IgG paling mudah berdifusi ke dalam jaringan ekstrasvaskular dan melakukan aktivitas antibodi di jaringan. IgG pulalah yang umumnya melapisi mikroorganisme sehingga partikel itu lebih mudah difagositosis, disamping itu IgG juga mampu menetralkan toksin dan virus (3). IgG dan komplemen bekerja saling membantu sebagai opsonin pada pemusnahan antigen. IgG memiliki sifat opsonin dan efektif karena sel-sel fagosit, monosit, dan makrofag, mempunyai reseptor untuk fraksi Fc dari IgG (Fc γ -R) sehingga dapat mempererat hubungan antara fagosit dengan sel sasaran. Opsonin dalam bahasa Yunani berarti menyiapkan untuk dimakan. Selanjutnya proses opsonisasi tersebut dibantu oleh reseptor untuk komplemen pada permukaan fagosit (1).

IgG berperan dalam imunitas seluler karena dapat merusak antigen sel melalui interaksi dengan sistem komplemen atau melalui efek sitolitik sel NK, eosinofil, neutrofil yang semuanya memiliki Fc γ -R. Sel NK me-

rupakan efektor dari *Antibodi Dependent Cell mediated Cytotoxicity* (ADCC). ADCC tidak hanya merusak sel tunggal, tetapi juga mikroorganisme multiseluler seperti telur skistosoma. Peranan efektor ADCC ini juga penting dalam penghancuran kanker, penolakan transplan dan penyakit autoimun, sedangkan ADCC melalui neutrofil dan eosinofil berperan pada infestasi parasit. Kadar IgG meninggi pada infeksi kronis dan penyakit autoimun (1).

II.8 Teknik Imunokimia

Antibodi merupakan komponen imunitas didapat yang melindungi tubuh terhadap infeksi mikroorganisme dan produknya yang toksik. Oleh karena itu interaksi antara antigen dan antibodi sangat penting dan banyak digunakan *invitro* untuk tujuan diagnostik. Interaksi antara antigen dan antibodi dapat menimbulkan berbagai akibat antara lain presipitasi (bila antigen merupakan bahan larut dalam garam fisiologik), aglutinasi (bila antigen merupakan bahan tidak larut/partikel-partikel kecil), netralisasi toksin dan aktivasi komplemen. Kebanyakan reaksi tersebut disebabkan oleh interaksi antara antigen multivalen dan antibodi yang sedikitnya memiliki 2 tempat ikatan per molekul (19).

II.8.1 Imunopresipitasi

Teknik imunopresipitasi merupakan salah satu cara yang banyak dipakai untuk mengukur kadar antigen atau antibodi. Antibodi yang direaksikan dengan antigen spesifik membentuk kompleks yang tidak larut

(presipitat) yang dapat diukur dengan berbagai cara. Reaksi presipitasi dapat dilangsungkan dalam media cair maupun media semi solid (gel).

Perbandingan antigen dengan antibodi merupakan faktor terpenting dalam reaksi presipitasi. Pembentukan presipitat terjadi apabila antara konsentrasi antigen dengan antibodi terjadi kesetimbangan. Kondisi antigen berlebihan akan mengakibatkan melarutnya kembali kompleks yang terbentuk, sedangkan antibodi berlebihan menyebabkan kompleks antigen-antibodi tetap ada dalam larutan tanpa membentuk presipitat (20).

II.8.2 Aglutinasi

Reaksi aglutinasi terjadi dalam dua tahap, yaitu pertama-tama antibodi dengan salah satu reseptor pengikat antigen bereaksi dengan antigen. Karena pada umumnya antibodi memiliki lebih dari satu reseptor pengikat antigen maka pada tahap kedua dengan perantaraan reseptornya yang lain antibodi bereaksi dengan molekul antigen lain yang mungkin sudah berikatan dengan salah satu molekul antibodi sehingga dengan demikian terbentuklah gumpalan antigen-antibodi.

Aglutinasi baru dapat terjadi bila rasio antara antigen dan antibodi seimbang, disebut zona ekuivalen. Pada pengenceran serum yang tinggi kadar antibodi telah amat rendah, sehingga terdapat kelebihan antigen dan menimbulkan rasio antigen dan antibodi yang tidak seimbang. Zona ini disebut zona pasca (*post zone*) dan fenomenanya disebut fenomena zona pasca (*post zone phenomene*). Sebaliknya bila pada pengenceran serum yang rendah tes memberi hasil negatif, terdapat kelebihan antibodi

sehingga rasio antigen dan antibodi yang tidak seimbang lagi. Zona ini disebut zona pra (*prozone*) dan fenomenanya disebut fenomena zona pra (*prozone phenomene*) (20).

II.8.3 Hemaglutinasi pasif

Pada hemaglutinasi pasif, sel darah merah diaglutinasi oleh antibodi yang menyerang antigen yang telah digabungkan secara kimiawi pada permukaan sel darah merah. Jadi sel darah merah merupakan indikator nyata dari interaksi antigen dan antibodi.

Langkah pertama dari cara ini yaitu mensensitasi sel darah merah yaitu menggabungkan antigen ke dalamnya. Beberapa antigen polisakarida dapat diabsorpsi dengan stabil pada permukaan sel darah merah. Untuk antigen protein, larutan asam tanat atau krom klorida dapat digunakan untuk menggabungkan antigen pada sel darah merah.

Langkah terakhir yaitu dengan menambahkan sel darah merah yang telah disensitasi tadi ke dalam pengenceran bertingkat dari antibodi.

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III. 1 Alat dan Bahan yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan antara lain bejana maserasi, freezer, gelas kimia 100 ml, labu tentukur 100 ml, kandang Hewan, pipet mikro 50 μ l, jarum suntik, jarum oral, lemari pendingin, sentrifus (*Hettich*), timbangan analitik (Dragon 303), timbangan gram (*O'hauss*), timbangan hewan (Denver).

Bahan-bahan yang digunakan adalah air suling, herba sambiloto, etanol 70%, kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), sel darah merah domba 2% v/v, larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) steril, kain flanel, kapas, dan sumur mikrotiter (*wheel plate* 96 lubang).

III.2 Penyiapan Sampel Penelitian

III.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan berupa herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) yang diambil dari Bumi Tamalanrea Permai (BTP) Makassar Sulawesi Selatan. Herba sambiloto ditimbang sebanyak 500 g, lalu dibersihkan, dikeringkan, dan dipotong-potong kecil.

III.2.2 Pembuatan Ekstrak

Sampel yang telah kering ditimbang sebanyak 300 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi kemudian ditambahkan etanol 70%, ditutup dan direndam selama 5 hari pada temperatur kamar terlindung dari

cahaya. Selama proses perendaman larutan sekali-kali diaduk. Setelah 5 hari sampel disaring ke dalam wadah penampung kemudian ampasnya diperas dan dipisahkan antara ampas dan cairan penyari. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali dengan jumlah pelarut yang sama. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan dengan rotavapor sehingga diperoleh ekstrak yang kental.

III.2.3 Pembuatan Larutan Koloidal Natrium CMC 1%

Sebanyak 1 g Natrium CMC dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam 50 ml air suling suhu 70°C, sambil diaduk dengan pengaduk elektrik hingga terbentuk larutan koloidal dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml dengan air suling.

III.2.4 Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol

Ekstrak etanol kental yang diperoleh kemudiaan dibuat konsentrasi 0,37% b/v dengan menimbang ekstrak kental sebanyak 0,37 gram kemudiaan digerus dalam lumpang, lalu tambah larutan Na CMC 1% b/v, masukkan ke dalam labu tentukur 100 ml dan cukupkan hingga tanda.

III.3 Pengujian Aktivitas IgM dan IgG Pada Hewan Uji

III.3.1 Pembuatan *Phosphat Buffered Saline* (PBS)

Phosphat Buffered Saline (PBS) dibuat dengan cara mencampurkan larutan I yaitu larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,3 g/l dan NaCl 8,3 g/l sebanyak 280 ml dengan larutan II yaitu larutan NaH_2PO_4 1,42 g/l dan NaCl 8,5 g/l sebanyak 720 ml sampai diperoleh PBS dengan pH 7,2 (14).

III.3.2 Pembuatan Suspensi Sel Darah Merah Domba (SDMD) 2%

Sebanyak 1 ml darah domba ditampung dalam tabung bersih dan kering yang berisi dengan 1 mg EDTA yang berfungsi sebagai antikoagulan. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm untuk memisahkan sel darah merah domba (SDMD) dari plasmanya. Sel darah merah domba yang didapatkan dicuci dengan penambahan sejumlah besar *Phosphat Buffered Saline* (PBS) dalam tabung, lalu tabung tersebut dibolak-balik beberapa kali, setelah itu disentrifus kembali. Pencucian dilakukan paling sedikit 3 kali. Setelah disentrifus, PBS dikeluarkan sehingga yang tertinggal adalah SDMD 100%, lalu ditambahkan lagi PBS dengan jumlah yang sama hingga diperoleh suspensi SDMD 50%. Sebanyak 0,4 ml SDMD 50% diencerkan dengan 9,6 ml PBS hingga diperoleh suspensi antigen (SDMD 2% v/v) (14).

III.3.3 Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan yang sehat dengan bobot badan 1,5 – 2 kg, sebanyak 6 ekor yang masing-masing diberi perlakuan berbeda-beda (13).

III.3.4 Uji Aktivitas IgM Awal (Hemaglutinasi)

Sebelum diimunisasi, semua kelinci diambil darahnya melalui telinga sebanyak 1 ml. Kemudian diletakkan dalam suhu kamar selama 1-2 jam, lalu disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga diperoleh serum, lalu diencerkan dengan PBS dengan pengenceran 2 kali dimulai dari 1/4 sampai dengan 1/512, kemudian

masing-masing pengenceran dipipet 50 μ l, dimasukkan ke dalam plat mikrotiter lalu ditambahkan 50 μ l suspensi SDMD 2%, diinkubasi pada suhu 37° C selama 60 menit, lalu didiamkan selama 1x24 jam.

III.3.5 Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Pada perlakuan ini, mula-mula kelinci jantan diimunisasi dengan 10 ml/ekor suspensi sel darah merah domba 2% v/v secara intra peritoneal. Untuk perlakuan kontrol, diberikan Na CMC selanjutnya diberikan Ekstrak etanol herba sambiloto dengan konsentrasi 0,37% b/v dengan volume 20 ml/2,5 kg bobot badan secara oral, pemberian ekstrak dilakukan selama 5 hari berturut-turut. Pada hari keenam setelah imunisasi, darah kelinci diambil melalui vena marginalis untuk mengetahui aktivitas IgM, dan pada hari ke 11, darah kelinci jantan diambil secara intra vena untuk mengetahui aktivitas IgG.

III.3.6 Pengambilan Sampel Darah Hewan Uji

Sampel darah hewan uji diambil melalui vena marginalis sebanyak 1 ml pada hari keenam setelah imunisasi, diletakkan pada suhu kamar selama 1-2 jam hingga membeku/menggumpal lalu diambil serumnya (supernatan) dengan cara disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm.

III.3.7 Uji Hemaglutinasi

Serum yang diperoleh lalu diencerkan secara pengenceran bertingkat dengan *Phospat Buffered Saline* dengan perbandingan 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, dan 1/512. Dari masing-masing

perbandingan ini dipipet sebanyak 50 μ l dan diletakkan pada plat mikrotiter (*well plate* 96) untuk tiap konsentrasi ekstrak etanol herba sambiloto, setelah itu ditambahkan 50 μ l suspensi sel darah merah domba 2% v/v pada setiap sumur dan diaduk rata atau dihomogenkan selama 5 menit. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit dan didiamkan semalam pada suhu kamar. Setelah itu, dilakukan pengamatan pengenceran tertinggi dari setiap serum darah kelinci jantan yang masih dapat mengaglutinasi sel darah merah domba (14).

III.4 Pengumpulan data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan pengenceran tertinggi serum darah kelinci yang masih dapat mengaglutinasi sel darah merah domba dikumpulkan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Data Uji aktivitas imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin G (IgG) setelah pemberian ekstrak etanol herba sambiloto dengan konsentrasi 0,37% berdasarkan titer imunoglobulin M (IgM) pada kelinci jantan setelah diberikan SDMD 2 % dapat di lihat pada tabel 1.

Tabel 1. Nilai titer Imunoglobulin M dan G pada pemberian ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness)

Imunoglobulin	Perlakuan	Ulangan		
		1	2	3
IgM	Kontrol	0,806	1,162	0,806
	Ekstrak	3,214	3,214	3,568
IgG	Kontrol	0,204	0,806	0,204
	Ekstrak	2,612	2,612	3,214

IV.2 Pembahasan

Masuknya suatu benda asing ke dalam tubuh suatu makhluk hidup akan menimbulkan berbagai reaksi yang bertujuan mempertahankan keutuhan dirinya. Reaksi yang dikordinasi sel-sel, molekul-molekul terhadap mikroba dan bahan lainnya disebut respons imun. Sistem imun ini diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Pertahanan tubuh berkaitan dengan antibodi. Antibodi atau imunoglobulin adalah golongan protein yang dibentuk sel plasma (poliferasi sel B) akibat

kontak dengan antigen. Antibodi yang dibentuk terhadap antigen lain dan masing-masing hanya dapat berikatan dengan antigen yang relevan.

Pada penelitian ini dilakukan pengujian efek ekstrak etanol herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap aktivitas imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin G (IgG) pada kelinci jantan (*Oryctolagus cuniculus*). Tanaman yang digunakan adalah sambiloto, sebagai hewan coba dipilih kelinci jantan.

Sebelum diberi sediaan uji, ekstrak etanol herba sambiloto, hewan coba diimunisasi dengan Sel Darah Merah Domba (SDMD) 2% secara intraperitoneal. Imunisasi ini dimaksudkan untuk memberikan respon imun terhadap hewan coba dan pemberian sediaan uji dimaksudkan untuk lebih meningkatkan respon imun tersebut.

Antigen yang digunakan untuk diinduksi produksi antibodi adalah sel darah merah domba (SDMD) yang merupakan imunogen, yaitu antigen yang berasal dari gen spesies lain. SDMD merupakan antigen polivalen yang merupakan protein dengan determinan potensial yang lebih besar dibandingkan dengan antigen monovalen. Lagipula semakin asing antigen yang digunakan, semakin efektif ia menimbulkan respon imun. Antigen ini diinjeksikan ke tubuh kelinci secara intraperitoneal. Selang satu hari, kelinci diberikan ekstrak etanol herba sambiloto dengan konsentrasi 0,37% b/v secara oral selama 5 hari berturut-turut.

Hari ke-6, atau 5 hari setelah penginduksian SDMD, darah kelinci diambil secara intravena untuk mengamati aktivitas IgM dan hari ke-11

untuk IgG. Pengambilan darah untuk pengukuran IgM dan IgG harus dilakukan sesuai dengan hari yang ditentukan setelah pemberian SDMD sebab IgM dan IgG akan segera terbentuk pada selang hari tersebut setelah pemberian antigen.

Selama kurun waktu tersebut, diharapkan telah terjadi sensitasi sel B yang akan berproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi yaitu imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin G (IgG). Pada respon primer, terbentuknya IgG didahului dengan oleh IgM. IgM mulai terbentuk mulai hari pertama dan mencapai puncaknya antara hari kelima hingga ketujuh, setelah itu mulailah IgG disensitasi. Oleh karena itu, darah kelinci diambil pada hari keenam untuk pengamatan terhadap IgM dan setelah hari kesepuluh untuk pengamatan terhadap IgG karena IgG mencapai puncak pada hari 10 sampai 14 setelah pemaparan antigen.

Pengujian terhadap serum darah kelinci dilakukan dengan menambahkan antigen yang sama yaitu sel darah merah domba. Interaksi antara antigen dengan antibodi menyebabkan terjadinya reaksi sekunder, yaitu berupa aglutinasi atau presipitasi sebab antigen merupakan partikel-partikel kecil yang tidak larut. Reaksi aglutinasi baru dapat terjadi bila rasio antara antigen dan antibodi seimbang, sehingga terbentuk zona ekuivalen, dibantu oleh suhu yang tinggi ($37-56^{\circ}\text{C}$) dan oleh gerakan yang menambah kontak antigen dan antibodi (misalnya mengocok, mengaduk

dan memutar) serta berkumpulnya gumpalan memerlukan garam-garam yang berasal dari PBS yang digunakan.

Pengamatan dilakukan dengan melihat titer antibodi yaitu pengenceran tertinggi dari larutan yang masih menunjukkan reaksi aglutinasi. Dari hasil pengamatan titer antibodi, menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin G (IgG). Hal ini dapat dilihat dari nilai titer imunoglobulin M (IgM) yaitu masing-masing 3,214, 3,214 dan 3,568 jika dibandingkan dengan kontrol 0,806, 1,162 dan 0,806. Sementara aktivitas Imunoglobulin G ditunjukkan dengan nilai titer yaitu masing-masing 2,612, 2,612 dan 3,214 jika dibandingkan dengan kontrol 0,204, 0,806 dan 0,204.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian analisis data dan pembahasan maka disimpulkan bahwa Ekstrak Etanol Herba Sambiloto pada konsentrasi 0,37% dapat meningkatkan aktivitas imunoglobulin M (IgM) dan imunoglobulin G (IgG) pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*).

V.2 Saran

Perlu dilakukan identifikasi dan isolasi kandungan kimia dari daun sambiloto yang dapat meningkatkan respon sistem imun.

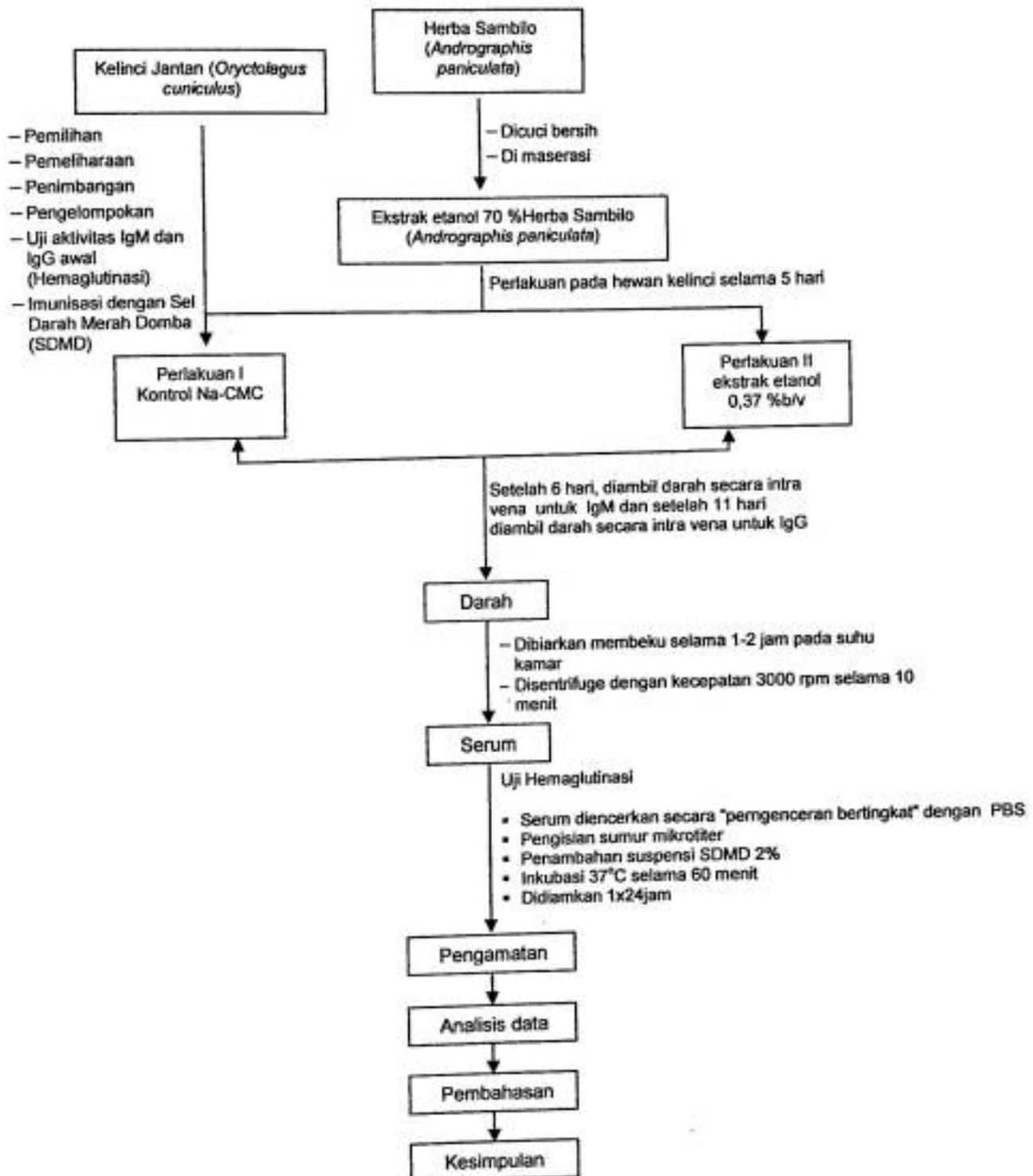
DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaja, K. *Imunologi Dasar*. Ed.4 Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2004. hal 8-12, 19-20, 76, 79
2. Guyton, A. *Fisiologi manusia dan mekanisme penyakit*. Ed.3 Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 1995. hal.60-61
3. Kresno, S.,B. *Imonologi: Diagnosa Dan Prosedur Laboratorium*. Edisi Keempat, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 2004. hal. 4-5,7,10-12,15-16, 44-47, 53-56, 408-409
4. Taslim, M.R, *Pengaruh infus Herba Sambiloto (Andrographis paniculata, Ness) Terhadap penurunan Kadar Glukosa Darah Kelinci.*, Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin, Makassar. 1995.
5. Prapansa, EP. & Marianto, SP, *Khasiat & manfaat sambiloto raja pahit penakluk aneka penyakit.*, Agromedia Pustaka. Jakarta. 2003. hal.4,6,13
6. Sastroamijoyo, S., *Obat Asli Indonesia*, Dian Rakyat, Jakarta. 2001., hal.219.
7. Winarto, W, P. *Sambiloto : Budi Daya dan pemanfaatan untuk Obat*, Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta. 2003. Hal.2-8
8. Heyne, K. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid III, Badan Litbang Departemen Kehutanan Jakarta. 1987. hal. 1756.
9. Wijayakusuma, H., *Tumbuhan berkhasiat Obat di Indonesia* Jilid II, Pustaka Kartini Jakarta. 1992 Hal.117-119.
10. Parrot, EL., *Pharmaceutical Teknologi Fundamental Pharmaceutical*, 1979, Burgess Publishing Company. 353.
11. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1986. hal. 5,15.
12. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia*. Ed. 3. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 1979. hal. 9

13. Malole MBM, & Pramono CSU. *Penggunaan hewan-hewan percobaan di laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antara, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 1989. hal. 24
14. Habibie. *Uji Efek Ekstrak Etanol Daun Mimba (Azadirachta indica A. Juss) terhadap Aktivitas Immunoglobulin M (IgM) Mencit Jantan (Mus musculus)*. Skripsi, Jurusan Farmasi. F MIPA. UNHAS. Makassar. 2006.
15. Roitt, I. *Essential Immunology*, 8th ed, Black Well Scientific Publications, London. 1994. Hal. 43.
16. Barrer, J. *Textbook of Immunology*, 5th ed. C.V. Mosby Company. USA. 1988. hal. 26
17. Wahab, S. dan Julia, M. *Sistem Imun, Imunisasi, dan Penyakit Imun*. Widya Medika. Jakarta. 2002. hal. 17
18. Rose, N. et al. *Principles of Immunology*. Macmillan Publishing CO, Newyork. 1973. hal. 124
19. Clancy, J. *Basic Concepts in Immunology*, McGraw-Hill Companies, Singapore. 2000. hal. 19, 20, 26
20. Kimbal, J.W. *Introduction to Immunology*, 2nd ed, Macmillan. Publishing Company, New York. 1986. hal. 96, 98
21. Himpunan Dokter Ahli Penyakit Dalam. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Jakarta. 2001. hal. 7-8

LAMPIRAN I SKEMA KERJA

**SKEMA KERJA EFEK EKSTRAK ETANOL HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness)
TERHADAP AKTIVITAS IgM DAN IgG PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*)**



LAMPIRAN II
GAMBARAN HASIL TITRASI IMUNOGLOBULIN PADA SUMURAN

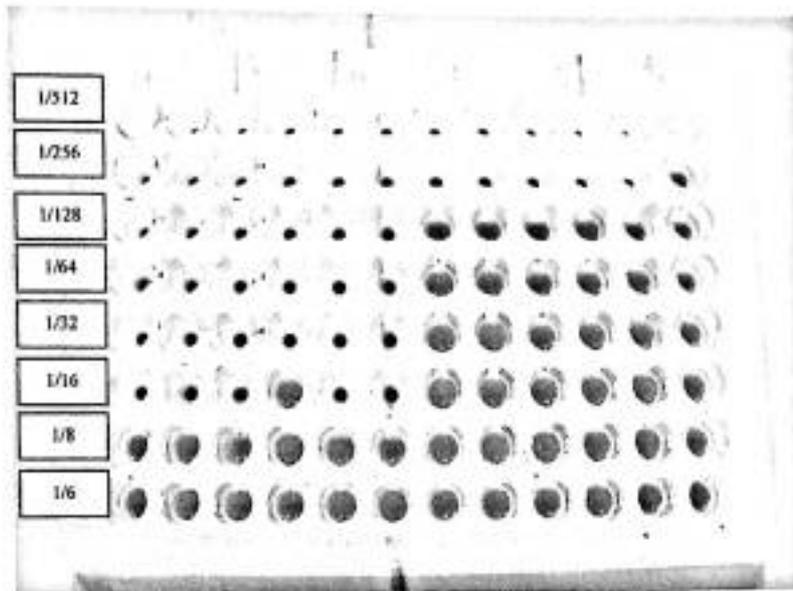


Gambar 1 : Foto data titer imunoglobulin awal pada sumur mikro titrasi sebelum pemberian ekstrak.

	K1	K2	K3	E1	E2	E3
1/512	-	-	-	-	-	-
1/256	-	-	-	-	-	-
1/128	-	-	-	-	-	-
1/64	-	-	-	-	-	-
1/32	-	-	-	-	-	-
1/16	-	-	-	-	-	-
1/8	-	-	-	-	-	-
1/6	-	-	-	-	-	-

Keterangan :

- K1, K2, K3 = Kontrol Negatif
- E1, E2, E3 = Ekstrak Etanol Sambiloto 0,37%
- = Tidak terjadi Aglutinasi

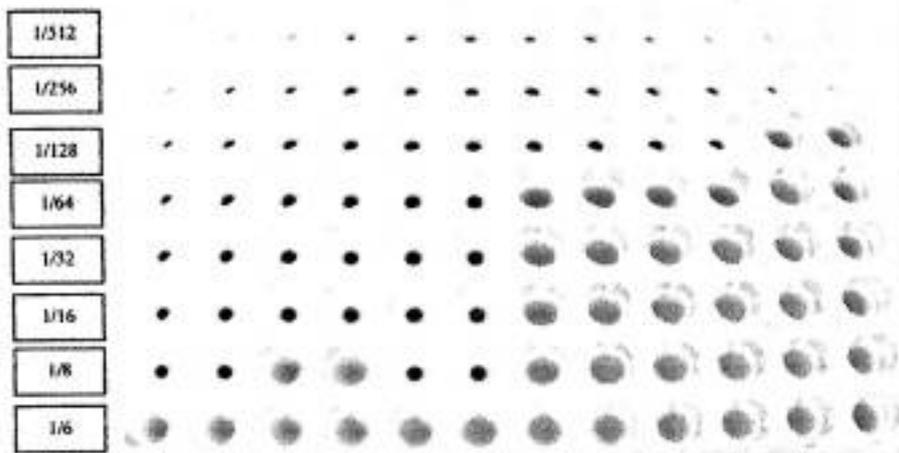


Gambar 2 : Foto hasil uji hemaglutinasi pada plat mikrotiter untuk pengamatan aktivitas Immunoglobulin M (IgM)

	K1	K2	K3	E1	E2	E3
1/512	-	-	-	-	-	-
1/256	-	-	-	-	-	+
1/128	-	-	-	+	+	+
1/64	-	-	-	+	+	+
1/32	-	-	-	+	+	+
1/16	-	+	-	+	+	+
1/8	+	+	+	+	+	+
1/6	+	+	+	+	+	+

Keterangan :

K1, K2, K3 = Kontrol Negatif
 E1, E2, E3 = Ekstrak Etanol Sambiloto 0,37%
 + = Terjadi Aglutinasi



Gambar 3 : Foto Hasil uji hemaglutinasi pada plat mikrotiter untuk pengamatan aktivitas Imunoglobulin G (IgG)

	K1	K2	K3	E1	E2	E3
1/512	-	-	-	-	-	-
1/256	-	-	-	-	-	-
1/128	-	-	-	-	-	+
1/64	-	-	-	+	+	+
1/32	-	-	-	+	+	+
1/16	-	-	-	+	+	+
1/8	-	+	-	+	+	+
1/6	+	+	+	+	+	+

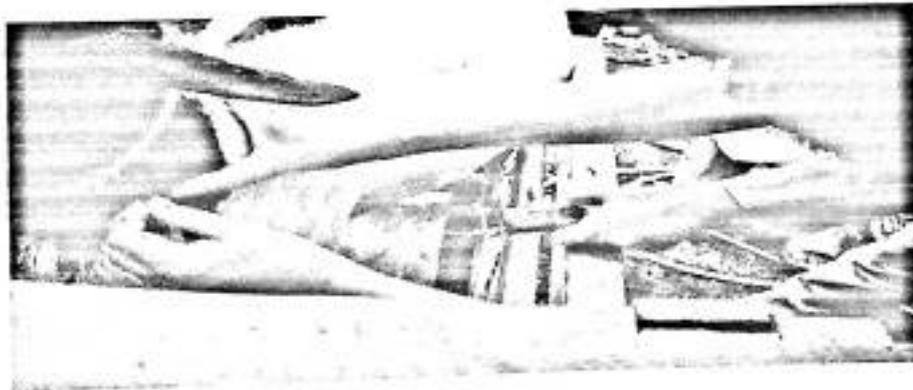
Keterangan :

- K1, K2, K3 = Kontrol Negatif
- E1, E2, E3 = Ekstrak Etanol Sambiloto 0,37%
- + = Terjadi Aglutinasi
- = Tidak terjadi Aglutinasi

LAMPIRAN III
FOTO-FOTO PELAKSANAAN PENELITIAN



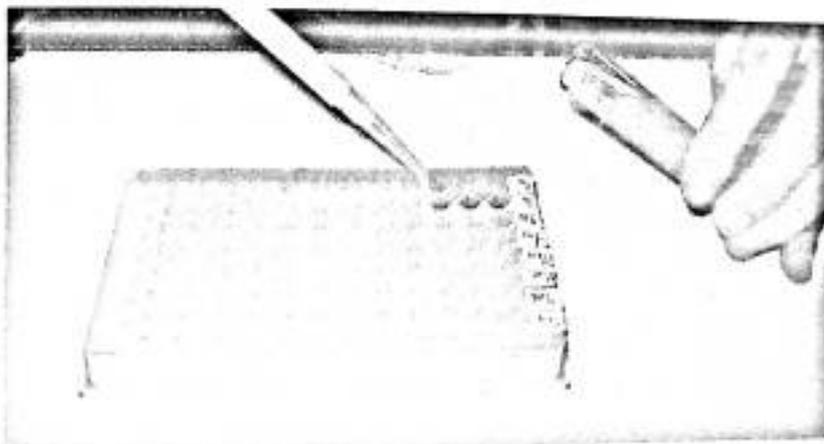
Gambar 4 : Foto Domba sumber antigen
(Sumber : Laboratorium Kesehatan Makassar)



Gambar 5 : Foto Pada Saat Pengambilan Antigen
(Sumber : Laboratorium Kesehatan Makassar)



Gambar 6 : Foto pengisian sumur mikro titrasi dengan PBS dan serum darah kelinci
(Sumber : Ruang Laboratorium Imunologi Kesehatan Makassar)



Gambar 7 : Foto penambahan antigen (SDMD) kedalam sumur yang sebelumnya telah diisi dengan PPS dan serum darah Kelinci.
(Sumber : Ruang Laboratorium Imunologi Kesehatan Makassar)