



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN SEDIAAN TEH
KOMBINASI KALIKS ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa*) DAN
HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica*) DENGAN METODE UJI
HIPERSENSITIVITAS TIPE LAMBAT DAN HITUNG
JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA MENCIT**

SKRIPSI

DWITYA ANDARWATI

0305050221

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN SEDIAAN TEH
KOMBINASI KALIKS ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa*) DAN
HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica*) DENGAN METODE UJI
HIPERSENSITIVITAS TIPE LAMBAT DAN HITUNG
JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA MENCIT**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**DWITYA ANDARWATI
0305050221**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Dwitya Andarwati

NPM : 0305050221

Tanda Tangan :

Tanggal : Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Dwitya Andarwati
NPM : 0305050221
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Immunostimulan Sediaan Teh Kombinasi Kaliks Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan Herba Pegagan (*Centella asiatica*) dengan Metode Uji Hipersensitivitas Tipe Lambat dan Hitung Jumlah Sel Limfosit pada Mencit

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Katrin, MS. (.....)

Pembimbing II : Dra. Juheini Amin, M.Si. (.....)

Penguji I : Dr. Yahdiana Harahap, MS. (.....)

Penguji II : Dr. Harmita, Apt. (.....)

Penguji III : Dra. Rosmaladewi Aziz, Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : Juli 2010

KATA PENGANTAR

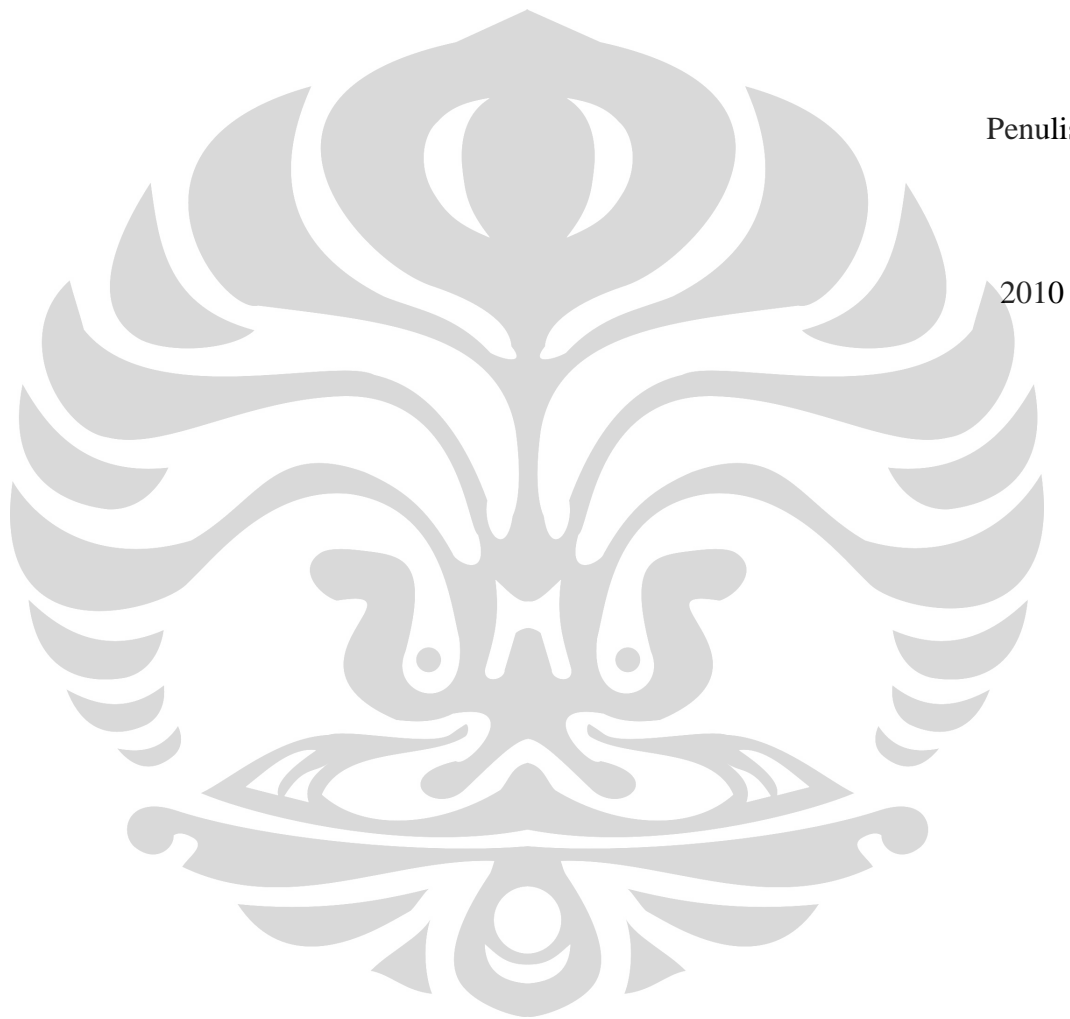
Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunianya maka saya dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik berkat adanya bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada pihak yang telah memberikan bantuan, bimbingan serta dorongan baik moril maupun materil.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada:

1. Dr. Yahdiana Harahap, MS. selaku ketua departemen Farmasi Universitas Indonesia dan Dr. Berna Elya, MS. selaku koordinator pendidikan.
2. Dr. Katrin, MS., selaku dosen pembimbing pertama yang telah menyediakan waktu, pikiran, fasilitas, dan tenaga.
3. Dra. Juheini Amin, M.Si., selaku dosen pembimbing pertama yang telah menyediakan waktu, pikiran, fasilitas, dan tenaga.
4. Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS. selaku pembimbing akademik.
5. Dr. Maryati Kurniadi, M.Farm. selaku ketua Laboratorium Kimia Analisis Kualitatif.
6. Dr. Retnosari Andrajati selaku ketua Laboratorium Farmakologi.
7. Bapak, Ibu dan semua keluarga atas doa dan dukungannya.
8. Seluruh karyawan Departemen Farmasi
9. Teman-teman farmasi regular 2005 dan 2006.
10. Seluruh pihak yang telah membantu demi kelancaran pengerjaan skripsi ini.

Saya menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengharapkan adanya kritik dan saran agar dapat memperbaiki diri di masa yang akan datang. Semoga skripsi ini dapat berguna bagi siapapun yang membacanya.



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dwitya Andarwati

NPM : 0305050221

Program Studi : Farmasi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Aktivitas Imunostimulan Sediaan Teh Kombinasi Kaliks Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan Herba Pegagan (*Centella asiatica*) dengan Metode Uji Hipersensitivitas Tipe Lambat dan Hitung Jumlah Sel Limfosit pada Mencit

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : Juli 2010

Yang menyatakan

(Dwitya Andarwati)

ABSTRAK

Nama : Dwitya Andarwati
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Aktivitas Imunostimulan Sediaan Teh Kombinasi Kaliks Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan Herba Pegagan (*Centella asiatica*) dengan Metode Uji Hipersensitivitas Tipe Lambat dan Hitung Jumlah Limfosit pada Mencit

Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) telah dilaporkan memiliki potensi untuk merangsang sistem imun. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas imunostimulan sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan dengan perbandingan 1:9 dengan metode hipersensitivitas tipe lambat/DTH dan hitung jumlah sel limfosit limpa. Masing-masing metode menggunakan 32 ekor mencit ddY yang dibagi ke dalam 8 kelompok. Kelompok 1 diberi kontrol CMC 0,5%, kelompok 2 diberi pembanding levamisol 0,45 mg/0,7 ml/20g bb, kelompok 3 diberi pembanding sediaan cair herbal X 0,52 ml/20g bb, kelompok 4 diberi dosis I rosella dan pegagan sebanyak (7,8 mg + 70,2 mg)/20g bb, kelompok 5 diberi dosis II rosella dan pegagan sebanyak (5,16 mg + 140,4 mg)/20g bb, kelompok 6 diberi dosis III rosella dan pegagan sebanyak (31,2 mg + 280,8)/20g bb, kelompok 7 diberi rosella sebanyak 7,8 mg/20g bb dan kelompok 8 diberi pegagan sebanyak 70,2 mg/20g bb. Pada hari ke-0, setiap mencit diimunisasi dengan 0,1 ml sel darah merah domba (SDMD) 2% secara intraperitoneal, kemudian diberi perlakuan selama 7 hari. Pada hari ke-8, setiap mencit diimunisasi kedua dengan 0,1 ml SDMD 2% secara subplantar untuk uji DTH dan secara intraperitoneal untuk uji limfosit. Ketebalan kaki mencit diukur dengan menggunakan "Vernier caliper", sedangkan jumlah sel limfosit dihitung menggunakan hemositometer dengan pewarna *trypan blue*. Sediaan teh kombinasi dosis III dapat meningkatkan jumlah sel limfosit dan aktivitas DTH, namun peningkatannya tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol ($p > 0,05$).

Kata kunci : hipersensitivitas tipe lambat, imunostimulan, limfosit, pegagan (*Centella asiatica*), rosella (*Hibiscus sabdariffa*)
xiii+56 halaman : 8 gambar; 9 tabel; 16 lampiran
Daftar acuan : 30 (1971-2009)

ABSTRACT

Name : Dwitya Andarwati
Program Study : Pharmacy
Title : Immunostimulant activity of combination tea of *Hibiscus sabdariffa* calyx and *Centella asiatica* herb with delayed-type hypersensitivity and lymphocyte count methods in mice

Hibiscus sabdariffa (HS) and *Centella asiatica* (CA) have been reported to possess immunostimulant activity. This research was carried out to know the immunostimulant activity of combination tea made of HS calyces and CA herbs in comparison 1:9 with delayed type hypersensitivity (DTH) and lymphocyte count methods. This activity was examined using thirty two male ddY mice each method, divided randomly into eight groups: control group CMC 0,5%, positive control group (levamisole 0,45 mg/0,7 ml/20g and herb X solution 0,52 ml/20g), combination dose I (7,8 mg + 70,2 mg)/20g, combination dose II (5,16 mg + 140,4 mg)/20g, combination dose III (31,2 mg + 280,8 mg)/20g, roselle dose 7,8 mg/20g and pegagan dose 70,2 mg/20g. On day 0, mice were immunized by an intraperitoneal route of 0,1 ml sheep red blood cell (SRBC) 2%, the test solution was given orally on day 1 until day 7. On day 8, each mouse was given second immunized with the same amount of SRBC by subcutaneous route for DTH method and by intraperitoneal route for lymphocyte method. The thickness of the right hind foot pad was measured using "Vernier Caliper" 24 and 48 hours after second immunized. The lymphocyte were counted using haemocytometer with trypan blue staining. The result showed that immunostimulant activity was dose dependent in a nonlinear fashion with the optimal dose of dose III (31,2 mg roselle and 280,8mg pegagan)/20g, but was not significantly increased.

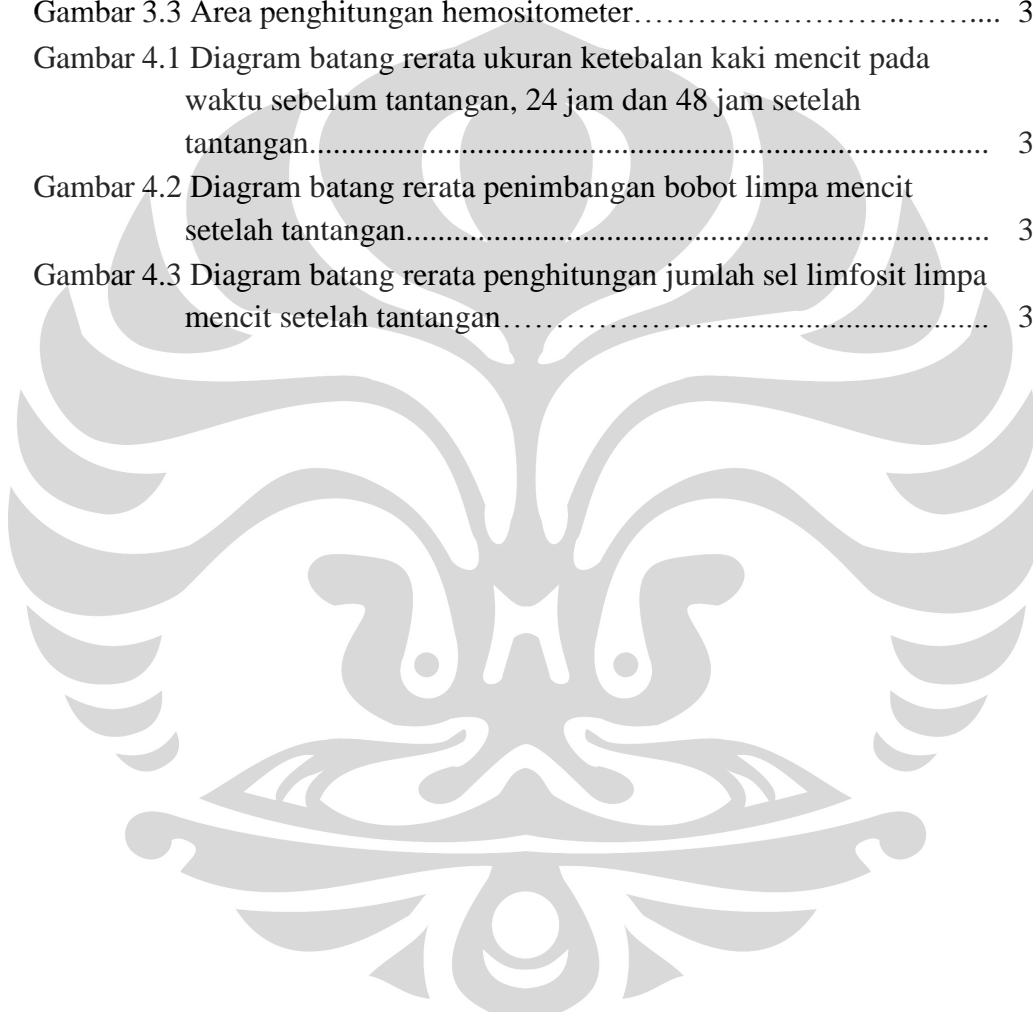
Keywords : *Centella asiatica*, delayed-type hypersensitivity, *Hibiscus sabdariffa*, immunostimulant, lymphocyte
xiii+56 pages : 8 pictures; 9 tables; 16 appendixes
Bibliography : 30 (1971-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Rosela (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	3
2.2 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	5
2.3 Levamisol.....	7
2.4 Sistem Imun.....	8
2.5 Imunostimulan.....	11
2.6 Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat / DTH.....	13
2.7 Proliferasi Limfosit.....	13
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN.....	15
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	15
3.2 Alat dan Bahan.....	15
3.3 Cara Kerja.....	16
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	28
5.1 Kesimpulan.....	28
5.2 Saran.....	28
DAFTAR ACUAN.....	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman <i>Hibiscus sabdariffa</i> dan Kaliks Rosella.....	32
Gambar 2.2 Tanaman <i>Centella asiatica</i>	32
Gambar 3.1 Mencit galur ddY berumur 2-3 bulan.....	32
Gambar 3.2 Pembedahan mencit untuk pengambilan limpa.....	33
Gambar 3.3 Area penghitungan hemositometer.....	33
Gambar 4.1 Diagram batang rerata ukuran ketebalan kaki mencit pada waktu sebelum tantangan, 24 jam dan 48 jam setelah tantangan.....	34
Gambar 4.2 Diagram batang rerata penimbangan bobot limpa mencit setelah tantangan.....	34
Gambar 4.3 Diagram batang rerata penghitungan jumlah sel limfosit limpa mencit setelah tantangan.....	35



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rerata hasil pengukuran ketebalan kaki mencit sebelum dan sesudah pemberian tantangan.....	24
Tabel 4.2 Hasil pengukuran ketebalan kaki mencit sebelum pemberian tantangan.....	36
Tabel 4.3 Hasil pengukuran ketebalan kaki mencit pada jam ke-24 setelah pemberian tantangan.....	36
Tabel 4.4 Hasil pengukuran ketebalan kaki mencit pada jam ke-48 setelah pemberian tantangan	36
Tabel 4.5 Respon hipersensitivitas tipe lambat (DTH) pada mencit setelah tantangan.....	25
Tabel 4.6 Hasil uji aktivitas imunostimulan berdasarkan bobot limpa dan jumlah sel limfosit limpa.....	26
Tabel 4.7 Bobot badan mencit pada uji bobot limpa dan hitung sel limfosit limpa.....	37
Tabel 4.8 Hasil penimbangan bobot limpa.....	37
Tabel 4.9 Hasil penghitungan jumlah sel limfosit limpa.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penetapan dosis.....	38
Lampiran 2. Perhitungan sediaan teh.....	40
Lampiran 3. Determinasi tanaman rosela dan pegagan.....	43
Lampiran 4. Uji distribusi normal Shapiro-Wilk terhadap data ukuran ketebalan kaki pada 24 jam setelah tantangan.....	44
Lampiran 5. Uji homogenitas Varian Levene terhadap data ukuran ketebalan kaki pada 24 jam setelah tantangan.....	45
Lampiran 6. Uji Analisis Varian Satu Arah terhadap data ukuran ketebalan kaki pada 24 jam setelah tantangan.....	46
Lampiran 7. Uji distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap data ukuran ketebalan kaki pada 48 jam setelah tantangan.....	47
Lampiran 8. Uji homogenitas Varian Levene terhadap data ukuran ketebalan kaki pada 48 jam setelah tantangan.....	48
Lampiran 9. Uji analisis Varian Satu Arah terhadap data ukuran ketebalan kaki pada 48 jam setelah tantangan.....	49
Lampiran 10. Uji distribusi normal Shapiro-Wilk terhadap data bobot limpa relatif.....	50
Lampiran 11. Uji homogenitas Varian Levene terhadap data bobot limpa relatif.....	51
Lampiran 12. Uji Analisis Varian Satu Arah terhadap data bobot limpa relatif.....	52
Lampiran 13. Uji distribusi normal Shapiro-Wilk terhadap data jumlah sel limfosit.....	53
Lampiran 14. Uji homogenitas Varian Levene terhadap data jumlah sel limfosit.....	54
Lampiran 15. Uji Analisis Varian Satu Arah terhadap data jumlah sel limfosit.....	55
Lampiran 16. Analisis uji Kruskal Wallis terhadap data jumlah sel limfosit.....	56

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, misalnya bakteri, virus, fungus, protozoa dan parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi yang terjadi pada orang normal umumnya singkat dan jarang meninggalkan kerusakan permanen. Hal ini, disebabkan tubuh manusia memiliki suatu sistem yang disebut sistem imun yang memberikan respons dan melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen tersebut (Roitt, Brostoff, & Male, 1996). 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 memusnahkan sumber antigen tersebut.

Fungsi sistem imun dapat terganggu sehingga menimbulkan ketidakseimbangan yang dapat bermanifestasi menjadi infeksi berulang, predisposisi terhadap keganasan dan autoimunitas. Keadaan seperti itu dapat diperbaiki, satu diantaranya dengan menggunakan bahan yang bersifat imunostimulator. Penelitian mengenai peran senyawa imunostimulan terhadap peningkatan mekanisme pertahanan tubuh dan penggunaannya sebagai penunjang pada pengobatan suatu penyakit semakin berkembang dari tahun ke tahun. Hal ini disebabkan secara klinis imunostimulator memiliki peranan strategis, baik dalam pengobatan maupun pencegahan suatu penyakit.

Indonesia merupakan negara yang kaya akan berbagai jenis tumbuhan, sebagian diantaranya telah dibuktikan mempunyai khasiat sebagai obat dan telah digunakan sejak zaman dahulu sampai saat ini (Sriningsih & Wibowo, 2008).

Pegagan telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional baik dalam bentuk bahan segar, kering maupun dalam bentuk ramuan (jamu). Di Thailand, pegagan dikenal dengan sebutan "Buabok" dan telah lama digunakan untuk pengobatan alternatif pada penyakit retardasi mental, inflamasi, rematik, gangguan pernapasan, asma, bronkitis, epilepsi dan defisiensi sistem imun (Farnsworth & Bunyaphatsara, 1992). Tumbuhan ini juga dapat digunakan

untuk penyembuhan luka, mempunyai aktivitas anti-tumor, anti-anxietas, anti-viral, imunostimulan dan anti-hepatoma (Punturee, Wild, Kasinrek, & Vinitketkumnuen, 2005).

Teh dari kaliks rosella telah banyak dimanfaatkan oleh berbagai negara untuk pengobatan atau perawatan tekanan darah tinggi, penyakit hati, demam dan anemia. Uji aktivitas farmakologi dari ekstrak kaliks rosella menunjukkan adanya aktivitas antioksidan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, antipiretik (Reanmongkol & Itharat, 2007), antimikroba, anti-inflamasi (Ogundipe, Moody, Oluwole, & Fakeye, 1998) dan imunostimulan (Fakeye et al., 2008).

Tanaman yang mengandung antioksidan dapat mempengaruhi sistem imun dengan cara melindungi komponen-komponen sistem imun agar terhindar dari kerusakan akibat senyawa radikal bebas (Wong, 2009). Pada penelitian sebelumnya telah diuji bahwa sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Indrata, 2009). Oleh karena itu, pada penelitian ini diuji aktivitas imunostimulan dari sediaan teh kombinasi tersebut.

1.2 Tujuan penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan memiliki aktivitas imunostimulan dengan metode hipersensitivitas tipe lambat/DTH dan hitung jumlah sel limfosit limpa.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rosella (*Hibiscus sabdariffa*)

2.1.1 Deskripsi umum

Dunia	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Dillenidae
Bangsa	: Malvales
Suku	: Malvaceae
Marga	: Hibiscus
Jenis	: <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Jones & Luchsinger, 1987)
Nama daerah	: Gamet walanda (Sunda), kasturi roriha (Ternate)

Rosella merupakan tumbuhan semak tegak yang tumbuh dalam periode 4-6 bulan. Tanaman ini kebanyakan bercabang, memiliki bunga dan batang yang sewarna dan biasanya mencolok, memiliki daun berwarna hijau gelap sampai dengan merah, dan memiliki kulit dan batang yang berserat kuat. Berbagai macam varietas bunga dapat ditemukan di beberapa kota di Afrika barat, diantaranya berwarna merah, kuning, dan hijau. Bunga rosella, dengan jumlah kelopak antara 3 – 7 buah, memiliki putik sekaligus serbuk sari sehingga tidak memerlukan serbuk sari dari bunga rosella lain untuk bereproduksi. Kaliks rosella menutupi kulit dari bijinya dan dapat matang dengan cepat sehingga dapat dipanen 15 hari setelah berbunga (Heyne, 1987; Prosea, 1999). Gambar tanaman rosella dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Rosella dapat hidup di daerah yang memiliki iklim lembab dan hangat pada daerah tropis dan sub tropis. Selain itu, tanaman ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan tanaman tropis dan sub tropis lainnya yaitu dapat bertahan dalam cuaca yang sangat dingin serta dapat hidup dalam ruangan yang memiliki sedikit pencahayaan, akan tetapi pertumbuhan terbaik diperoleh pada ruang terbuka dengan cahaya matahari (Morton, 1987).

2.1.2 Kandungan kimia

Kaliks rosella mengandung antioksidan yang berasal dari kandungan flavonoid, gossypetin, hibiscetin dan sabdaretin. Kaliks segarnya juga banyak mengandung riboflavin, asam askorbat, niasin, karoten, kalsium dan besi. Beberapa antosianin dari rosella yang diidentifikasi melalui proses kromatografi mencakup delfinidin-3-sambubiosid, sianidin-3-sambubiosid dan delfinidin-3-glukosa (Fasoyiro, Ashaye, Adeola, & Samuel, 2005)

2.1.3 Khasiat dan kegunaan

Teh dari kaliks rosella telah banyak digunakan oleh berbagai negara untuk pengobatan atau perawatan tekanan darah tinggi, penyakit hati, demam, anemia. Uji aktivitas farmakologi dari ekstrak kaliks rosella menunjukkan adanya aktivitas antioksidan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, aktivitas antipiretik (Reanmongkol & Itharat, 2007), antimikroba, anti-inflamasi (Ogundipe, Moody, Oluwole, & Fakeye, 1998) dan imunostimulan (Fakeye et al., 2008).

Kaliks rosella mengandung asam organik, polisakarida, dan flavonoid yang bermanfaat mencegah penyakit kanker, mengendalikan tekanan darah, melancarkan peredaran darah dan melancarkan buang air besar. Secara tradisional, tanaman ini banyak dimanfaatkan untuk mengatasi batuk, lesu, demam dan gusi berdarah. Ekstrak kaliks rosella juga bersifat antipasmodik, antihelmintik dan antibakteri.

Kaliks rosella mempunyai efek laksatif dan dapat meningkatkan urinasi karena adanya dua kandungan diuretik yaitu asam askorbat dan asam glikolat. Disamping itu, rosella juga mengandung asam sitrat yang dapat meningkatkan aliran darah ke permukaan kulit dan melebarkan pori untuk mendinginkan kulit (Qi, Chin, Malekian, & Granger, 2005)

2.2 Pegagan (*Centella asiatica*)

2.2.1 Deskripsi umum

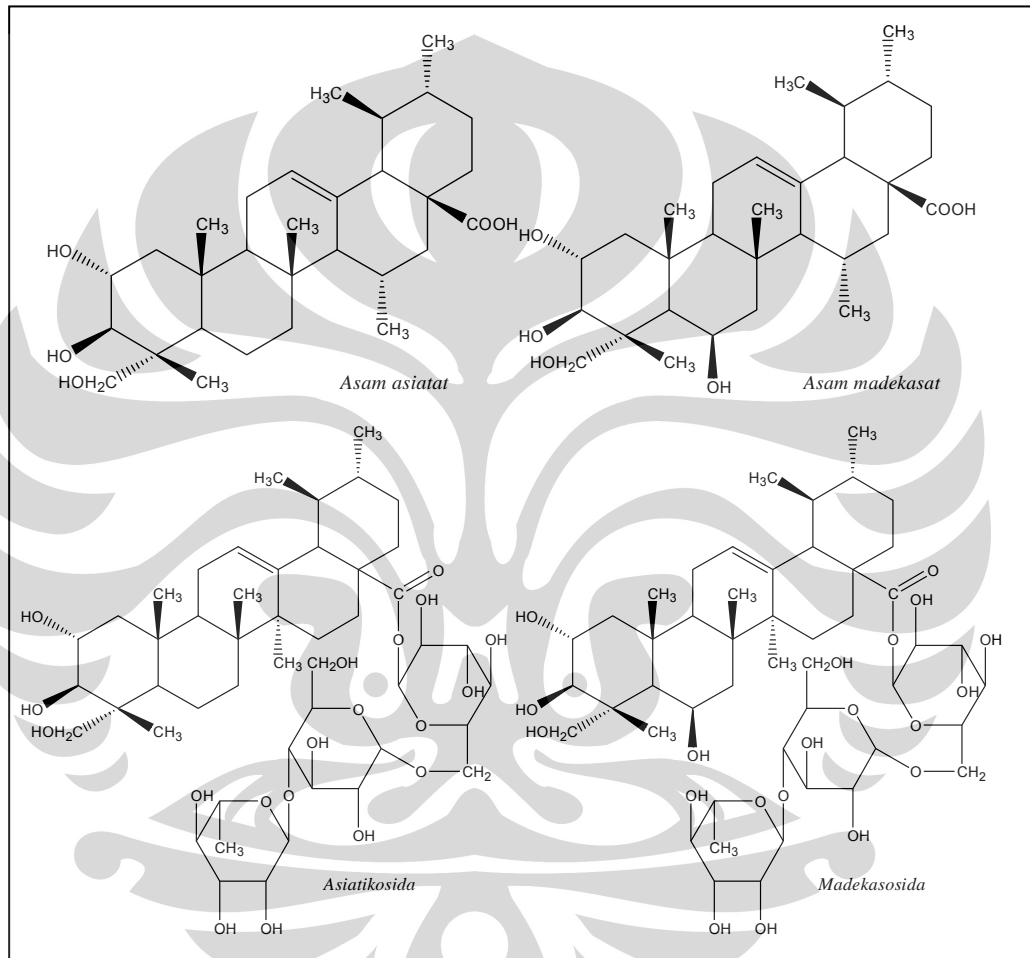
Dunia	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Bangsa	: Apiales
Suku	: Apiaceae
Marga	: Centella
Jenis	: <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban (Jones & Luchsinger, 1987)
Nama daerah	: kori-kori (Halmahera), antanan (Sunda)

Pegagan merupakan tera atau herba tahunan tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang melata dengan panjang 10 cm sampai 80 cm. Daun tunggal, tersusun dalam roset yang terdiri atas 2 sampai 10 daun, kadang-kadang agak berbulu, tangkai daun panjang sampai 50 mm, helai daun berbentuk ginjal, lebar dan bundar dengan garis tengah 1 cm sampai 7 cm, tepi daun beringgit atau beringgit sampai bergerigi, terutama kearah pangkal daun. Perbungaan berupa payung tunggal atau 3 sampai 5 bersama-sama keluar dari ketiak daun; panjang tangkai perbungaan 5 mm sampai 50 mm, lebih pendek dari tangkai daun. Daun pelindung 2, panjang 3 mm sampai 4 mm, bentuk bundar telur; tajuk berwarna merah lembayung, panjang 1 mm sampai 1,5 mm, lebar sampai 0,75 mm. Buah berbentuk pipih, lebar lebih kurang 7 mm dan tinggi lebih kurang 3 mm, berlekuk dua, berusuk jelas, berwarna kuning kecoklatan, berdinding agak tebal (Heyne, 1987; Prosea, 1999). Gambar tanaman pegagan dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Tanaman ini dapat tumbuh liar di seluruh Indonesia pada umumnya di daerah beriklim tropis, dataran rendah hingga ketinggian 2.500 m di atas permukaan laut. Budidaya tanaman ini di tempat yang terbuka atau sedikit terlindung, pada tanah yang lembab dan subur seperti di padang rumput, tepi parit, di antara batu-batu, di tepi jalan dan tembok. Di Jawa pernah dipakai pada suatu pertanaman untuk mencegah erosi dan sebagai penutup tanah (*Vademekum bahan obat alam*, 1989).

2.2.2 Kandungan kimia

Dari herba pegagan telah dilaporkan mengandung beberapa saponin triterpen dan sapogenin. Senyawa utama saponin triterpen adalah asiaticosida dengan sapogenin asam asiatat, yang merupakan derivat dari asam trihidroksisenoat. Asiaticosida merupakan triglikosida dari asam asiatat dengan satu manosa dan dua glukosa.



(Sumber: Tang & Eisenbrand, 1992 “telah diolah kembali”)

Gambar 2.1. Struktur kandungan kimia herba pegagan

Dari herba pegagan yang ditemukan di Madagaskar, diketahui mengandung triterpen asam madasiatat dan asam madekasat. Selain itu ditemukan juga asam brahmat dari pegagan yang berasal dari India. Madekasosida dengan aglikon asam madekasat, ditemukan dari pegagan yang berasal dari China. Semua triterpen ini

merupakan derivat dari asam ursenoat dan mempunyai rangka ursen (Tang & Eisenbrand, 1992).

2.2.3 Khasiat dan kegunaan

Senyawa saponin triterpenoida yang disebut asiatikosida, berkhasiat sebagai imunostimulator, anti lepra, penyembuh luka dan radang tenggorokan. Herba ini juga mengandung tanin yang dapat membantu mengatasi radang usus dan sakit perut. Selain itu juga dapat melancarkan peredaran darah.

Herba pegagan juga dapat digunakan untuk pengobatan luka bakar, borok kulit, pencegahan keloid dan luka hipertropik. Ekstrak tumbuhan ini digunakan untuk pengobatan luka bakar tingkat dua dan tiga. Selain itu, juga digunakan secara topikal untuk mempercepat penyembuhan pada kasus setelah operasi kronis dan luka paska trauma. Ekstraknya digunakan secara oral untuk pengobatan borok lambung. Herba pegagan diketahui digunakan untuk pengobatan borok akibat lepra dan kelainan vena (WHO, 1999).

Herba pegagan telah lama digunakan untuk pengobatan alternatif pada penyakit retardasi mental, inflamasi, rematik, gangguan pernapasan, asma, bronkitis, epilepsi, dan defisiensi sistem imun (Farnsworth & Bunyaphatsara, 1992). Tumbuhan ini juga dapat digunakan untuk penyembuhan luka, mempunyai aktivitas anti-tumor, anti-anxietas, anti-viral, imunostimulan dan anti-hepatoma (Punturee, Wild, Kasinrek, & Vinitketkumnue, 2005).

2.3 Levamisol

Levamisol sebelumnya biasa digunakan untuk membunuh parasit usus pada hewan dan sebagai obat anthelminthik pada manusia, namun saat ini telah diketahui bahwa obat ini dapat juga digunakan sebagai imunoregulator dan imunostimulator. Levamisol dapat memperbaiki respon imun dengan meningkatkan kemotaksis makrofag dan fungsi limfosit T (Spector, Munjal, & Schimdt, 1998). Levamisol bekerja dengan mempengaruhi kadar sel T menjadi lebih tinggi dari sel B, menyebabkan terjadinya reaktivitas kutan terhadap antigen hipersensitivitas tipe lambat dan meningkatkan fungsi sel T-helper, sel T-suppresor, dan sel T-sitotoksik (Sasmito, 2006).

2.4 Sistem imun

Semua mekanisme yang digunakan untuk mempertahankan keutuhan tubuh (homeostatis) sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan asing seperti mikroorganisme, dalam lingkungan hidup, tidak hanya terhadap penyakit tetapi juga untuk mempertahankan tubuh agar tubuh tidak menjadi rusak disebut dengan sistem imun (Baratawidjaja, 1996).

Proses pengenalan antigen dilakukan oleh unsur utama sistem imun yaitu limfosit yang kemudian diikuti oleh fase efektor yang melibatkan berbagai jenis sel. Pengenalan antigen sangat penting dalam fungsi sistem imun normal, karena limfosit harus mengenal semua antigen pada patogen potensial.

Bila sistem imun terpapar oleh zat asing, maka ada dua jenis respon imun yang mungkin terjadi, yaitu respon imun alamiah atau non-spesifik (*natural/innate*) dan respon imun didapat atau spesifik (*adaptive/acquired*).

2.4.1 Respon imun non spesifik

Umumnya respon ini merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*) dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh zat tersebut. Komponen-komponen utama sistem imun non spesifik adalah pertahanan fisik dan kimiawi seperti epitel dan substansi antimikroba yang diproduksi pada permukaan epitel; berbagai jenis protein dalam darah termasuk diantaranya komponen-komponen sistem komplemen, mediator inflamasi lainnya dan berbagai sitokin, sel-sel fagosit yaitu sel-sel polimorfonuklear (PMN) dan makrofag serta sel *natural killer* (NK). Satu diantara upaya tubuh untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen, misalnya antigen bakteri, adalah dengan menghancurkan bakteri bersangkutan dengan proses fagositosis. Dalam hal ini leukosit yang merupakan fagosit berperan penting khususnya makrofag, demikian pula neutrofil dan monosit. Agar dapat terjadi fagositosis, sel-sel fagosit tersebut harus berada dalam jarak dekat dengan partikel bakteri, sehingga fagosit harus bergerak menuju sarannya.

Selain fagositosis, manifestasi respon imun non spesifik lainnya adalah reaksi inflamasi. Sel-sel sistem imun tersebar di seluruh tubuh tetapi bila terjadi infeksi di satu tempat, maka sel-sel sistem imun itu dan produk-produk yang dihasilkannya akan dipusatkan ke lokasi infeksi. Reaksi ini dapat terjadi akibat

dilepaskannya mediator–mediator tertentu oleh beberapa jenis sel misalnya histamin yang dilepaskan oleh basofil dan mastosit, *vasoactive amine* yang dilepaskan trombosit, serta anafilatoksin yang berasal dari komponen-komponen komplemen yang merangsang pelepasan mediator–mediator oleh mastosit dan basofil sebagai reaksi umpan balik.

Mediator-mediator ini antara lain dapat merangsang bergerakinya sel-sel polimorfonuklear menuju lokasi masuknya antigen serta meningkatkan permeabilitas dinding vascular yang mengakibatkan eksudasi protein plasma dan cairan. Gejala inilah yang disebut respon inflamasi akut (Kresno, 2001).

2.4.2 Respon imun spesifik

Berbeda dengan sistem imun nonspesifik, sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda asing bagi dirinya. Benda asing yang muncul dalam tubuh segera dikenal oleh sistem imun spesifik, sehingga terjadi sensitisasi sel-sel sistem imun tersebut. Bila sel sistem imun tersebut berpapasan kembali dengan benda asing yang sama, maka akan dikenal lebih cepat dan kemudian dihancurkan olehnya. Oleh karena sistem tersebut hanya dapat menghancurkan benda asing yang sudah dikenal sebelumnya, maka sistem ini disebut spesifik. Sistem imun spesifik dapat bekerja tanpa bantuan sistem imun nonspesifik untuk menghancurkan benda asing yang berbahaya bagi tubuh; tetapi pada umumnya terjalin kerjasama yang baik antara antibodi-komplemen fagosit dan antara sel T-makrofag (Baratawidjaja, 1996).

Dalam mengenali antigen secara spesifik, ada 3 macam molekul pengikat antigen yang terlibat, yaitu reseptor antigen pada permukaan sel B (immunoglobulin permukaan, sIg), reseptor antigen pada sel T (TCR) dan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas I dan II. Reseptor antigen pada permukaan limfosit sangat polimorfik dan berbeda antara satu klon dengan klon yang lain. Diversitas ini, diperoleh saat perkembangan limfosit. Molekul MHC juga sangat polimorfik dan berbeda anggota populasi satu dengan yang lain tetapi tidak berbeda dalam satu individu. Fungsinya adalah menyajikan fragmen-fragmen antigen untuk dikenali oleh limfosit T. MHC kelas I oleh semua sel berinti dan trombosit sedangkan MHC kelas II diekspresikan secara terbatas. Reseptor sel T dan MHC, merupakan molekul-molekul yang saling melengkapi

untuk mengenali antigen yang disajikan oleh atau berasal dari dalam sel lain (Kresno, 2001).

Respon imun spesifik dibagi menjadi dua golongan, yaitu:

2.4.2.1 Sistem imun spesifik humoral

Respon imun humoral dilaksanakan oleh sel B dan produknya, yaitu antibodi, yang berfungsi dalam pertahanan terhadap mikroba ekstraseluler. Sel B tersebut berasal dari sel asal multipoten (Baratawidjaja, 1996). Respon ini diawali dengan diferensiasi limfosit B menjadi satu populasi sel plasma yang memproduksi dan melepaskan antibodi spesifik ke dalam darah. Agar limfosit B berdiferensiasi dan membentuk antibodi, diperlukan bantuan limfosit *T-helper* yang menerima sinyal dari makrofag, merangsang sel B untuk memproduksi antibodi. Selain oleh sel *T-helper*, produksi antibodi juga diatur oleh sel *T-supresor* sedemikian rupa, sehingga produksi antibodi seimbang dan sesuai dengan yang dibutuhkan (Kresno, 2001).

2.4.2.2 Sistem imun spesifik selular

Dalam sistem imun spesifik selular, yang berperan adalah sel T atau limfosit T. Sel tersebut juga berasal dari sel asal yang sama seperti sel B. Pada orang dewasa, sel T dibentuk di dalam sumsum tulang, tetapi proliferasi dan diferensiasinya terjadi di dalam kelenjar timus atas pengaruh berbagai faktor asal timus. 90-95% dari semua sel timus tersebut mati dan hanya 5-10% menjadi matang dan meninggalkan timus masuk ke dalam sirkulasi (Baratawidjaja, 1996).

Banyak mikroorganisme yang hidup dan berkembang biak intraseluler, antara lain virus dan mikroba intraseluler seperti *M.tuberculosis* yang hidup di dalam makrofag sehingga sulit dijangkau oleh antibodi. Untuk melawan mikroorganisme tersebut ada dua cara yang dapat terjadi yaitu sel terinfeksi dapat dimusnahkan melalui sistem efektor ekstraseluler, misalnya oleh sel T sitotoksik, atau sel terinfeksi diaktivasi, agar mampu memusnahkan mikroorganisme yang menginfeksi. Subpopulasi sel T yang disebut sel *T-helper* (*Th*) akan mengenali mikroorganisme atau antigen tersebut yang terdapat pada sel makrofag atau sel yang terinfeksi melalui reseptor TCR dan molekul MHC kelas-II. Sinyal yang diterima dari sel terinfeksi ini, menginduksi limfosit untuk memproduksi berbagai jenis limfokin, termasuk diantaranya interferon, yang dapat membantu

makrofag menghancurkan mikroorganisme tersebut. Subpopulasi sel T yang lain yang disebut sel T-sitotoksik (Tc), juga berfungsi menghancurkan mikroorganisme intraseluler yang disajikan melalui atau bersama-sama dengan MHC kelas I dengan cara kontak langsung antar-sel. Selain menghancurkan mikroorganisme secara langsung, sel T-sitotoksik juga menghasilkan γ -interferon yang mencegah penyebaran mikroorganisme ke sel-sel yang lain. Respon imun seluler juga merupakan mekanisme utama dalam pertahanan tubuh terhadap tumor (Kresno, 2001).

2.5 Imunostimulan

Cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut adalah imunostimulasi atau yang disebut juga imunopotensiasi. Imunostimulan merupakan bahan obat yang dapat meningkatkan fungsi sistem imun tubuh. Kerja imunostimulan ini adalah meningkatkan aktivitas sel-sel imun yang berhubungan dengan peningkatan respon imun spesifik atau non spesifik. Imunostimulan dapat merangsang terjadinya proliferasi, diferensiasi dan aktivitas sel-sel pengatur sistem imun antara lain sel fagosit, makrofag, limfosit T dan limfosit B atau mempengaruhi sistem komplemen.

Biological Response Modifier (BRM) adalah bahan-bahan yang dapat meningkatkan respons imun sehingga disebut juga imunostimulator. Berdasarkan asalnya, bahan tersebut dapat dibedakan menjadi bahan yang berasal dari biologik dan sintetik. Bahan yang berasal dari biologik seperti monoclo timus, limfokin, interferon, antibodi monoclonal, *transfer factor*/ekstrak leukosit, sel *lymphokin-activated killer* (LAK), bahan asal bakteri, dan bahan asal jamur. Sedangkan bahan yang terbuat dari sintetik yaitu levamisol, isoprinosin, muramil dipeptida (MDP), dan bahan-bahan lain.

Metode uji aktivitas imunostimulan dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

2.5.1 Uji aktivitas terhadap imunitas non spesifik :

2.5.1.1 Uji respon imun non spesifik seluler

- a. Meningkatkan kemampuan fagositosis dengan metode bersihan karbon
- b. Meningkatkan jumlah sel dalam organ imun dengan metode mikroskopik *smear test*, komponen system imun yang diuji granulosit
- c. Uji monosit dilakukan dengan metode yang berdasarkan fungsi monosit dalam mensekresi TNF- α misalnya dengan metode ELISA.

2.5.1.2 Uji respon imun non spesifik humoral

- a. Uji komplemen dilakukan dengan metode yang berdasarkan terjadinya reaksi hemolisis akibat peranan komplemen pada media semi solid.
- b. Uji migrasi leukosit dilakukan dengan metode yang berdasarkan hambatan migrasi leukosit, akibat pengaruh faktor kemotaksis.
- c. Uji interferon dilakukan dengan metode yang berdasarkan respon produksi interferon sebagai antiviral.

2.5.2 Uji aktivitas terhadap imunitas spesifik:

2.5.2.1 Uji respon imun spesifik seluler

- a. Uji hipersensitivitas tipe lambat
- b. Uji proliferasi limfosit T, berdasarkan pengembangan organ timus dan jumlah sel limfosit T

2.5.2.2 Uji respon imun spesifik humoral

- a. Uji proliferasi limfosit B yang dilakukan dengan metode yang berdasarkan pengembangan bobot limpa sebagai organ imun spesifik dan jumlah sel limfosit dalam limpa khususnya limfosit B yang berperan dalam produksi antibodi.
- b. Penentuan titer antibodi dilakukan dengan metode hemaglutinasi sel darah merah domba, sebagai antigen akibat reaksi dengan antibodi spesifik. Komponen sistem imun yang diuji adalah antibodi primer IgM atau antibodi IgG.

Metode uji aktivitas imunostimulan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah uji hipersensitivitas tipe lambat dan uji proliferasi limfosit.

2.6 Reaksi hipersensitivitas tipe IV/tipe lambat (*Delayed type hypersensitivity/DTH*)

Berdasarkan mekanisme reaksi imunologik yang terjadi, secara umum reaksi hipersensitivitas dibagi menjadi 4 golongan, yaitu reaksi hipersensitivitas tipe I, II, III, dan IV. Reaksi tipe I, II, dan III terjadi karena interaksi antara antigen dengan antibodi sehingga termasuk reaksi humoral, sedangkan reaksi tipe IV terjadi karena interaksi antara antigen dengan reseptor yang terdapat pada permukaan limfosit T dan mengaktifkan limfosit T sehingga termasuk reaksi selular. Limfosit adalah sel yang immunospesifik dan pada permukaannya mempunyai berbagai reseptor antigen, baik untuk antigen jaringan maupun untuk molekul-molekul kecil yang melekat pada membran sel dan kemudian bersifat sebagai antigen (Kresno, 2001). Reaksi hipersensitivitas tipe lambat, pada umumnya timbul lebih dari 8 jam dan mencapai puncaknya pada 24 sampai 72 jam setelah pemaparan kedua oleh antigen. Reaksi yang timbul berupa reaksi inflamasi yang ditandai dengan eritema dan indurasi akibat dari pembesaran vaskuler dan peningkatan permeabilitas postkapiler vena. Reaksi ini dipengaruhi oleh aktivitas sel T. Ketika sel T spesifik bereaksi terhadap antigen protein asing yang muncul, serangkaian interaksi akan timbul dan mengaktifkan sel T_H1 untuk mensekresi sitokin (IL-2, TNF- β dan IFN- γ) yang akan merubah fungsi makrofag. Akumulasi makrofag dan limfosit di daerah paparan antigen akan menyebabkan timbulnya granuloma, yaitu kumpulan limfosit dan makrofag yang berada diantara helaian serabut jaringan penghubung (Elgert, 1996).

2.7 Proliferasi limfosit

Limpa adalah organ imun sekunder yang berperan penting dalam pertahanan tubuh spesifik. Sebelum distimulasi oleh antigen, limfosit berada dalam keadaan istirahat atau dalam fase G_0 siklus sel. Ada dugaan bahwa apabila tidak distimulasi oleh antigen, limfosit ini akan mati dan populasinya dipertahankan dalam jumlah tertentu dengan pembentukan sel-sel baru dari sel prekursor dalam sumsum tulang. Umur limfosit yang tidak distimulasi tidak diketahui pasti, mungkin beberapa bulan atau tahun. Sel-sel limfosit yang distimulasi akan masuk ke dalam fase G_1 siklus sel, kemudian bentuknya akan

berubah menjadi lebih besar (limfoblast) dan mengandung RNA lebih banyak (fase sintesis, fase S) dan akan membelah.

Limfosit T memegang peran penting dalam mengontrol respon imun secara keseluruhan. Untuk mengawali respon imun, reseptor $\alpha\beta$ pada permukaan sel T harus berikatan dengan kompleks MHC kelas I atau II yang mengandung fragmen antigen atau fragmen *self-peptide* yang dihasilkan oleh degradasi protein. Pada umumnya, respon imun selular diawali dengan interaksi antara sel Th dengan antigen yang disajikan oleh APC, atau interaksi antara sel T sitotoksik dengan sel sasaran. Interaksi antara reseptor sel T (TCR), atau lebih tepat lagi kompleks CD3-TCR, dengan ligand Ag-MHC mengakibatkan suatu proses kompleks yang berakhir dengan terlaksananya fungsi sel T dan proliferasi sel yang diperlukan untuk menambah pool sel T yang dapat mengenal antigen. Disamping CD3, molekul permukaan lain yang juga berperan dalam transduksi sinyal pada sel T adalah CD4/CD8, dan CD45. Satu diantara respon terhadap transduksi sinyal pada sel T adalah pengaturan ekspresi dan transkripsi gen IL-2, suatu limfokin yang esensial bagi sel T untuk melewati siklus sel fase G1/S dan masuk ke fase M (mitosis) (Kresno, 2001).

Organ limpa sebagai tempat berproliferasi akan lebih berkembang/meningkat bobotnya dengan pemberian senyawa-senyawa beraktivitas imunostimulan. Peningkatan bobot limpa dan jumlah sel limfosit limpa dari mencit yang telah diinduksi sistem imunnya menunjukkan peningkatan aktivitas proliferasi dalam organ imun yang bersangkutan dan menggambarkan peningkatan sistem imun spesifik (Puri, Saxena, Saxena, & Saxena, 1993).

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Farmakologi Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok selama lebih kurang 3 bulan.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah blender, ayakan B30, kertas teh, kapas, *water bath*, autoklaf, sonde lambung, spuit (Terumo), timbangan analitik (Ohaus), sentrifugator, tabung sentrifugasi 15 ml, mikropipet (Socorex), alat-alat bedah ringan, hemositometer (Improved Neubauer), *microtube* dan alat-alat gelas.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan uji

Pada penelitian ini, bahan uji yang digunakan adalah simplisia kaliks rosella dan herba pegagan yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik-Bogor, levamisol (PT. Bintang Toedjoe) dan sediaan cair herbal X.

3.2.2.2 Bahan kimia

Darah merah domba (Laboratorium Mikrobiologi FKUI, Jakarta), Natrium klorida 0,9%, larutan dapar fosfat pH 7,4, CMC (penyalur PT. Brataco Chemica), aquadest, alkohol 70%, dan *trypan blue*.

3.2.2.3 Hewan uji

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus Musculus*) galur *ddY*, usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram sebanyak 64 ekor. Mencit ini diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner (BALITVET), Bogor (Gambar 3.1).

3.3 Cara kerja

3.3.1 Persiapan hewan uji

Mencit yang digunakan total berjumlah 64 ekor yang diaklimatisasi selama 14 hari dalam kandang dengan kondisi standar temperatur ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Pada waktu tersebut, dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum seperti kondisi mata dan bulu. Selain itu dilakukan penimbangan berat badan setiap hari untuk memilih mencit yang sehat yang selanjutnya akan digunakan dalam percobaan.

3.3.2 Penetapan dosis

Dosis yang digunakan merupakan dosis yang biasa digunakan masyarakat ketika meminum teh yaitu sebesar 3 gram teh yang diseduh dalam segelas air 200 ml. Dosis tersebut dijadikan dosis pertama dan dosis lainnya merupakan kelipatan dua dari dosis ini yaitu 6 g/hari dan 12 g/hari. Dosis yang digunakan untuk hewan uji didapat dengan mengalikan dosis-dosis tersebut dengan faktor konversi dan faktor farmakokinetik yaitu sebesar 0,078 g/20g bb mencit/hari; 0,156 g/20g bb mencit/hari dan 0,312 g/20g bb mencit/hari (Perhitungan penetapan dosis selengkapnya terdapat pada lampiran 1).

3.3.3 Pembuatan larutan uji

3.3.3.1 Determinasi tumbuhan

Tumbuhan yang akan diuji dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Balitbang Botani, Pustlitbang Biologi, LIPI Bogor.

3.3.3.2 Penyiapan simplisia uji

Simplisia kaliks rosella dan herba pegagan yang diperoleh diblender sampai menjadi serbuk. Serbuk yang didapat kemudian diayak dengan ayakan B30 untuk mendapatkan serbuk kasar.

3.3.3.3 Pembuatan sediaan teh

Serbuk kasar kaliks rosella dan herba pegagan dibuat menjadi sediaan teh dalam bentuk kantung teh. Hal ini dilakukan baik terhadap simplisia rosella, pegagan, maupun kombinasi simplisia rosella dan pegagan (perbandingan 1 : 9). Teh-teh tersebut diseduh dengan air panas bersuhu 80 - 90°C, kemudian biarkan 5 menit. Kondisi penyeduhan yaitu 1 kantung teh (3 gram simplisia) dalam 200 ml

air panas. Setelah itu, teh dibuat menjadi ekstrak kental dengan menggunakan penangas air. Larutan teh yang akan diberikan pada mencit dibuat dengan mensuspensikan ekstrak kental dalam larutan CMC 0,5% (Perhitungan sediaan teh dapat dilihat pada lampiran 2).

3.3.3.4 Pembuatan larutan levamisol

Dosis levamisol yang digunakan ialah 0,45 mg/0,7 ml/20g BB untuk mencit (Sasmito et al., 2006). Larutan levamisol dibuat dengan cara disuspensikan menggunakan CMC 0,5%. Sebanyak 12,6 miligram levamisol disuspensikan dalam CMC 0,5% sebanyak 19,6 ml.

3.3.4 Pembuatan larutan pereaksi

3.3.4.1 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 7,4

Larutan dapar fosfat pH 7,4 dibuat dengan mencampurkan 50,0 ml kalium dihidrogenfosfat 0,2 M dengan 39,1 ml natrium hidroksida 0,2 N dan diencerkan dengan aquadest bebas karbondioksida secukupnya hingga 200 ml. Larutan yang telah dibuat kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf (*Farmakope Indonesia ed III*, 1979).

3.3.4.2 Pembuatan larutan *trypan blue* 0,4%

Serbuk *trypan blue* ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam larutan dapar fosfat sebanyak 12,5 ml.

3.3.5 Pembuatan larutan antigen sel darah merah domba (SDMD)

Darah domba yang telah diberi antikoagulan dipisahkan dari plasmanya dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Plasma yang terpisah kemudian dibuang dengan hati-hati menggunakan pipet Pasteur. Tambahkan NaCl 0,9% hingga tiga kali volume darah yang tersisa, lalu dihomogenkan dengan membolak-balik tabung. Suspensi yang didapat kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Supernatan yang didapat dibuang lalu lakukan pencucian kembali hingga supernatan yang didapat jernih. Setelah pencucian selesai, maka akan di dapat suspensi sel darah merah domba 100%. Kemudian sel darah merah domba tersebut diencerkan hingga menjadi 2% dengan menggunakan larutan NaCl 0,9%. Sebanyak 1 ml suspensi sel

darah merah domba 2% mengandung sel darah merah sebanyak 5×10^8 (Bekierkunst et al., 1971).

3.3.6 Pelaksanaan penelitian

Pada penelitian kali ini digunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan delapan kelompok perlakuan. Penelitian dilakukan menggunakan 32 ekor mencit putih untuk masing-masing metode, kemudian dibagi secara acak ke dalam delapan kelompok perlakuan. Kelompok I adalah kelompok kontrol normal yang diberikan larutan CMC 0,5%. Kelompok II adalah kelompok kontrol positif yang diberi levamisol, kelompok III adalah kelompok kontrol positif yang diberi sediaan herba X, kelompok IV adalah kelompok perlakuan yang diberi sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan (1:9) dengan dosis (0,0078 g + 0,0702 g)/20 gBB, kelompok V adalah kelompok perlakuan yang diberi sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan (1:9) dengan dosis (0,0156 g + 0,1404 g)/20 gBB, kelompok VI adalah kelompok perlakuan yang diberi sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan dengan perbandingan 1 : 9 dengan dosis (0,0312 g + 0,2808 g)/20 gBB, kelompok VII adalah kelompok perlakuan yang sediaan teh kaliks rosella dengan dosis 0,0078 g/20g bb mencit, kelompok VIII adalah kelompok perlakuan yang diberi sediaan teh herba pegagan dengan dosis 0,0702 g/20g bb mencit. Setiap kelompok diberi sediaan uji masing-masing selama 7 hari.

Dalam penelitian ini, jumlah ulangan yang dibutuhkan untuk tiap kelompok berdasarkan dengan rumus Federer, yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15 \quad (3.1)$$

Dimana t: jumlah kelompok perlakuan

n: jumlah ulangan mencit

Setelah dihitung menggunakan rumus Federer, maka didapat jumlah minimum mencit yang digunakan tiap kelompok adalah 4 ekor.

Tabel 3.1
Pembagian kelompok hewan uji

Kelompok	n (ekor)	Perlakuan
Kontrol negatif	4	Suspensi CMC 0,5%
Pembanding I	4	Suspensi levamisol dalam CMC 0,5% dosis 0,45 mg/0,7 ml/20 g bb
Pembanding II	4	Sediaan cair herbal X dosis 0,52 ml/20 g bb
Dosis kombinasi I	4	Suspensi teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan (1:9) dalam CMC 0,5% dosis (0,0078 g + 0,0702 g)/20 g bb
Dosis kombinasi II	4	Suspensi teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan (1:9) dalam CMC 0,5% dosis (0,0156 g + 0,1404 g)/20 g bb
Dosis kombinasi III	4	Suspensi teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan (1:9) dalam CMC 0,5% dosis (0,0312 g + 0,2808 g)/20 g bb
Dosis Rosella	4	Suspensi teh kaliks rosella dalam CMC 0,5% dosis 0,0078 g/20 g bb
Dosis Pegagan	4	Suspensi teh herba pegagan dalam CMC 0,5% dosis 0,0702 g/20 g bb

3.3.6.1 Uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat/DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*)

Semua mencit diinjeksikan dengan 0,1 ml suspensi sel darah merah domba 2% secara intraperitoneal pada hari ke-0. Pada hari ke-1 sampai ke-7 diberikan sediaan uji sekali sehari. Kelompok kontrol negatif diberi suspensi CMC 0,5%, sedangkan kelompok kontrol positif I diberi levamisol dan kelompok kontrol positif II diberi sediaan cair herba X. Pada hari ke-8 dilakukan injeksi antigen kedua/tantangan dengan 0,1 ml suspensi sel darah merah domba 2% secara subplantar pada telapak kaki kanan. Ketebalan telapak kaki kanan diukur pada waktu sebelum diberi injeksi kedua, kemudian 24 jam dan 48 jam setelah penyuntikan antigen secara subplantar menggunakan alat pengukur “Vernier calipers”. Peningkatan ketebalan kaki menunjukkan adanya induksi imun seluler (Atal et al., 1986).

3.3.6.2 Uji berdasarkan bobot limpa dan jumlah sel limfosit limpa

Semua mencit diinjeksikan dengan 0,1 ml suspensi sel darah merah domba 2% secara intraperitoneal pada hari ke-0. Pada hari ke-1 sampai ke-7 diberikan sediaan uji sekali sehari. Kelompok kontrol negatif diberi suspensi CMC 0,5%, sedangkan kelompok kontrol positif I diberi levamisol dan kelompok kontrol positif II diberi sediaan cair herba X. Pada hari ke-8 dilakukan injeksi antigen kedua/tantangan dengan 0,1 ml suspensi sel darah merah domba 2% secara intraperitoneal. 2 jam kemudian mencit dikorbankan untuk diambil limpanya (Puri et al., 1993).

3.3.6.2.1 Pengambilan organ limpa

Pembedahan dilakukan untuk mengambil organ limpa. Sebelum pembedahan, mencit dibunuh terlebih dahulu dengan menarik kepala dan ekornya, sehingga mencit dapat langsung mati. Mencit yang sudah mati diletakkan telentang pada papan bedah. Keempat kaki mencit diikat, bagian dada dan perut dibasahi dengan alcohol 70% kemudian dilakukan pembedahan. Limpa mencit berwarna merah gelap, tipis, dan berada di belakang usus. Limpa diambil dan dimasukkan kedalam vial yang berisi larutan dapar fosfat pH 7,4 dingin. Bersihkan limpa dari jaringan yang menempel, kemudian limpa ditimbang

(Gambar 3.2). Hitung kenaikan bobot relatif limpa dibandingkan dengan kontrol negatif.

$$\text{Bobot limpa relatif} = \frac{\text{Bobot limpa}}{\text{Bobot badan}} \times 100\% \quad (3.2)$$

3.3.6.2.2 Penghitungan sel limfosit limpa

Limpa yang telah ditimbang kemudian dihomogenkan, lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Tambahkan 10 ml larutan dapar fosfat pH 7,4 dingin dan sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Buang supernatan yang didapat, maka akan di dapat pellet sel di lapisan bagian bawah. Suspensikan pellet yang didapat dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 dingin sebanyak 5 ml.

Dengan menggunakan mikropipet, campur 0,1 ml suspensi sel, 0,1 ml trypan blue 0,4%, dan 0,8 ml larutan dapar fosfat pH 7,4 steril di dalam *mikrotube*. Diamkan pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian teteskan di atas hemositometer dengan hati-hati (Hybridoma techniques, 2009). Gambar area penghitungan hemositometer dapat dilihat pada Gambar 3.3.

Sel Imfosit yang masih hidup dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Sel limfosit hidup/ml} = \frac{\text{total sel dihitung} \times 10 \times 10^4}{4} \quad (3.3)$$

3.3.7 Pengolahan data

Data diolah secara statistik menggunakan SPSS 15.0. Analisis yang digunakan adalah uji distribusi normal (uji *Shapiro-Wilk*), uji homogenitas (uji *Levene*), lalu dilanjutkan dengan analisis varian (ANAVA) satu arah jika data dinyatakan terdistribusi normal dan homogen. Bila terdapat pengaruh nyata, maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan hewan uji

Penelitian ini diawali dengan penyiapan hewan uji, yaitu mencit putih jantan galur *ddY* berumur kira-kira 2-3 bulan dengan bobot badan 20 g sampai 30 g, karena pada umur tersebut, fungsi organ mencit sudah sempurna dan dianggap sudah dewasa. Pada umur tersebut, proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi mencit sudah berjalan optimal. Mencit dipilih sebagai hewan uji dengan beberapa pertimbangan yaitu harganya relatif murah, mudah didapat, mudah dalam penanganan dan pemeliharaannya, dan banyak digunakan untuk penelitian uji aktivitas imunostimulan. Pemilihan jenis kelamin jantan dilakukan untuk menghindari pengaruh hormonal yang umumnya terjadi pada mencit betina yang dapat mempengaruhi hasil uji.

Mencit yang digunakan dihitung berdasarkan rumus Federer yaitu menggunakan 4 mencit tiap kelompok dan semua mencit diaklimatisasi selama dua minggu yang bertujuan agar mencit beradaptasi dengan lingkungan baru.

4.2 Determinasi tumbuhan

Determinasi tumbuhan diperlukan untuk mengetahui kebenaran tumbuhan yang diteliti. Hasil determinasi kedua tumbuhan uji tersebut adalah *Hibiscus sabdariffa* L. dari suku Malvaceae dan *Centella asiatica* (L.) Urb. dari suku Apiaceae (Lampiran 3).

4.3 Penyiapan simplisia uji

Simplisia kaliks rosella dan herba pegagan yang diperoleh diblender sampai menjadi serbuk kasar, karena untuk mempermudah dalam pembuatan sediaan teh.

4.4 Pembuatan sediaan teh

Serbuk kasar kaliks rosella dan herba pegagan dimasukkan ke dalam kantung teh. Hal ini dilakukan untuk pembuatan dosis tunggal maupun dosis kombinasi rosella dan pegagan. Dosis kombinasi dibuat dengan mengkombinasikan rosella dan pegagan dengan perbandingan 1:9, karena pada perbandingan tersebut, teh dapat berfungsi sebagai antioksidan (Indrata, 2009).

Pembuatan sediaan teh dilakukan dengan mencelupkan kantung teh ke dalam air panas dengan suhu 80-90°C selama 5 menit, karena klorin yang terkandung dalam kertas teh akan larut jika dibiarkan lebih dari 5 menit. Setelah itu, sediaan teh diuapkan dengan menggunakan penangas air, hingga terbentuk ekstrak kental. Pemberian sediaan uji dilakukan dalam bentuk suspensi dari ekstrak kental dengan penambahan CMC 0,5%.

4.5. Pembuatan larutan levamisol

Levamisol digunakan sebagai kontrol pembanding karena merupakan satu diantara obat imunostimulan yang berasal dari bahan sintetik yang banyak digunakan digunakan sebagai kontrol pembanding pada penelitian uji aktivitas imunostimulan lainnya. Levamisol bekerja dengan mempengaruhi kadar sel T menjadi lebih tinggi dari sel B, menyebabkan terjadinya reaktivitas kutan terhadap antigen hipersensitivitas tipe lambat dan meningkatkan fungsi sel T-helper, sel T-suppresor, dan sel T-sitotoksik (Sasmito, 2006).

Dosis levamisol yang digunakan adalah 0,45 mg/0,7 ml/20g bb mencit (Sasmito et al., 2006). Levamisol juga dibuat dengan cara disuspensikan menggunakan CMC 0,5%.

4.6. Larutan dapar fosfat pH 7,4

Untuk mempertahankan nilai pH 7,4 digunakan larutan dapar fosfat pH 7,4.

4.7. Larutan *trypan blue* 0,4%

Pewarna *trypan blue* digunakan untuk mewarnai sel limfosit yang dihitung dalam hemositometer.

4.8. Larutan antigen sel darah merah domba

Darah domba yang telah diberi antikoagulan dipisahkan dari plasma dengan disentrifugasi selama 5 menit. Plasma yang terpisah dibuang menggunakan pipet, kemudian darah yang tersisa dicuci dengan menggunakan larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh lapisan supernatan jernih. Suspensi sel darah merah yang didapat kemudian diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% hingga volumenya menjadi 2%. Pemilihan konsentrasi sel darah merah domba 2% karena pada konsentrasi tersebut telah dapat merangsang sistem imun dari hewan uji.

4.9. Hasil uji aktivitas imunostimulan berdasarkan uji hipersensitivitas tipe lambat/DTH

Rerata hasil pengukuran ketebalan kaki mencit pada uji hipersensitivitas tipe lambat pada waktu sebelum injeksi tantangan, 24 jam, dan 48 jam setelah tantangan dapat dilihat pada Tabel 4.1 (Gambar 4.1). Data pengamatan lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.2, Tabel 4.3 dan Tabel 4.4.

Tabel 4.1 Rerata hasil pengukuran ketebalan kaki mencit sebelum dan sesudah pemberian tantangan

Perlakuan	Respon DTH sebelum tantangan (cm)	Respon DTH 24 jam (cm)	Respon DTH 48 jam (cm)
Kontrol negatif	0,1275±0,005	0,2300±0,019	0,1550±0,021
Pembanding I	0,1237±0,008	0,2237±0,045	0,1562±0,026
Pembanding II	0,1162±0,010	0,1750±0,013	0,1387±0,013
Dosis kombinasi I	0,1275±0,006	0,2312±0,040	0,1575±0,005
Dosis kombinasi II	0,1237±0,008	0,2050±0,024	0,1600±0,010
Dosis kombinasi III	0,1212±0,008	0,1937±0,025	0,1620±0,005
Rosella	0,1200±0,012	0,2175±0,019	0,1512±0,026
Pegagan	0,1212±0,008	0,2037±0,028	0,1712±0,015

Dari data yang didapat, pemberian dosis kombinasi I, II, III, dosis rosela dan pegagan, menunjukkan adanya peningkatan ketebalan kaki mencit jika dibandingkan dengan kontrol, pada waktu 48 jam setelah pemberian antigen tantangan (Tabel 4.5).

Tabel 4.5 Respon hipersensitivitas tipe lambat (DTH) pada mencit setelah tantangan

Perlakuan	Perubahan tebal kaki mencit sebelum dan sesudah tantangan (cm) pada jam ke- (setelah tantangan)				Kenaikan perubahan tebal kaki mencit terhadap kontrol (%) pada jam ke- (setelah tantangan)	
	24		48		24	48
		%		%		
Kontrol negatif	0,1025±0,015	80,21	0,0275±0,016	21,23	0	0
Pembanding I	0,100±0,039	79,98	0,0287±0,017	23,07	-02,43	04,36
Pembanding II	0,0587±0,014	51,27	0,0225±0,010	19,61	-42,73	-18,18
Dosis kombinasi I	0,1037±0,045	82,72	0,0300±0,009	23,81	01,17	09,09
Dosis kombinasi II	0,0812±0,033	67,18	0,0362±0,017	30,01	-20,78	31,62
Dosis kombinasi III	0,0712±0,028	60,90	0,0407±0,009	34,09	-30,53	48,00
Rosella	0,0975±0,027	83,72	0,0312±0,017	25,47	-04,87	13,45
Pegagan	0,0825±0,032	69,11	0,0500±0,020	42,02	-19,51	81,81

Metode pengamatan terhadap reaksi hipersensitivitas tipe lambat adalah untuk menguji efek bahan uji terhadap respon imun spesifik seluler. Reaksi ini dilakukan lokal pada kaki mencit dan respon yang terjadi berupa pembengkakan kaki tersebut akibat dari reaksi lokal seluler respon imun spesifik.

Hasil uji respon DTH pada waktu 24 dan 48 jam setelah pemberian tantangan menunjukkan adanya peningkatan ketebalan kaki, namun secara statistik peningkatannya tidak bermakna ($p > 0,05$). Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan respon imun yang terjadi meskipun tidak signifikan (lampiran 4-9).

Reaksi hipersensitivitas tipe lambat ini diinisiasi oleh pengaktifan limfosit T yang tersensitisasi dan diekspresikan secara lokal dengan infiltrasi seluler dan inflamasi. Rendahnya nilai levamisol dapat disebabkan karena penghambatan yang lemah dalam sistem imun seluler saat mengekspresikan imunitas sel

termediasi sehingga dapat menyebabkan terjadinya anti-inflamasi (Sharma et al., 1996).

4.10 Hasil uji aktivitas imunostimulan berdasarkan penimbangan bobot limpa dan hitung jumlah sel limfosit limpa

Hasil penghitungan rerata bobot limpa, rerata jumlah sel limfosit, serta kenaikan nilainya dibandingkan dengan kontrol negatif, dari mencit yang telah diberi perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.6. Data pengamatan bobot limpa dan penghitungan sel limfosit lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.7 dan 4.8. Bobot badan mencit yang digunakan untuk uji ini dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Tabel 4.6 Hasil uji aktivitas imunostimulan berdasarkan bobot limpa dan jumlah sel limfosit limpa

Perlakuan	Bobot mencit (gram)	Bobot limpa (gram)	Bobot limpa relatif (%)	Kenaikan bobot limpa relatif (%)	Jumlah sel limfosit/g limpa (10^7)	Kenaikan jumlah sel limfosit limpa terhadap kontrol (%)
Kontrol negatif	24,425±5,06	0,2771±0,08	1,1585±0,41	0	7,1637±2,67	0
Pembanding I	24,700±4,50	0,2824±0,09	1,1706±0,49	1,04	6,9250±3,19	-3,33
Pembanding II	21,050±5,19	0,2569±0,13	1,1772±0,46	1,61	7,2112±4,78	0,66
Dosis kombinasi I	25,775±4,13	0,2869±0,13	1,0760±0,34	-7,12	6,0612±1,11	-15,39
Dosis kombinasi II	28,275±4,09	0,2872±0,13	1,0076±0,38	-13,02	5,1737±0,43	-27,77
Dosis kombinasi III	25,850±2,63	0,2493±0,02	0,9705±0,10	-16,22	8,8775±3,42	23,92
Rosella	24,775±3,02	0,2258±0,05	0,9368±0,32	-19,13	6,0100±1,04	-16,1
Pegagan	26,175±3,86	0,2381±0,11	0,8929±0,29	-22,92	8,7187±3,68	21,71

Dari data di atas dapat diketahui bahwa tidak ada peningkatan bobot limpa jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Setelah diuji berdasarkan analisis juga menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna (Lampiran 10-13). Sedangkan pada uji hitung jumlah sel limfosit, terlihat adanya peningkatan jumlah sel limfosit limpa pada dosis kombinasi III dan dosis pegagan, namun setelah diuji

secara statistik menunjukkan tidak adanya peningkatan yang bermakna ($p > 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol negatif (Lampiran 14-16).

Pada metode uji berdasarkan bobot limpa dan jumlah sel limfosit limpa dilakukan penimbangan bobot limpa pada mencit yang diimunisasi dengan sel darah merah domba sebagai antigen. Organ limpa sebagai tempat berproliferasi akan berkembang/meningkat bobotnya dengan pemberian senyawa-senyawa beraktivitas imunostimulan. Peningkatan bobot limpa dan jumlah sel limfosit limpa dari mencit yang telah diinduksi sistem imunnya menunjukkan peningkatan aktivitas proliferasi dalam organ imun yang bersangkutan dan menggambarkan peningkatan sistem imun spesifik (Hay & Westwood, 2002).

Pada hari ke-8 setelah imunisasi, hewan coba diberikan injeksi kedua atau tantangan dengan sel darah merah domba 2% sebanyak 0,1 ml. Pemberian tantangan dilakukan secara intraperitoneal dengan maksud agar antigen dapat langsung direspon oleh limfosit T yang ada pada limpa. Pengambilan limpa dilakukan 2 jam setelah pemberian tantangan, karena limfosit T sudah bertambah jumlahnya yang disebut dengan proliferasi. Suspensi limfosit yang diperoleh lalu dihitung jumlahnya dengan menggunakan kamar hitung (hemositometer) setelah sebelumnya diberi pewarnaan dengan *trypan blue*. Penggunaan pewarna *trypan blue* dimaksudkan agar ada terlihat perbedaan antara sel limfosit dan sel lainnya.

Penggunaan parameter jumlah sel limfosit sebagai uji aktivitas imunostimulan mempunyai kelemahan, yaitu dapat terjadi kesalahan dalam penghitungan. Hal ini dapat disebabkan pada saat menghitung, sel limfosit sudah banyak yang mati sehingga akan mengurangi jumlah sel limfosit yang dihitung.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan tidak mempunyai aktivitas imunostimulan ditinjau dari metode hipersensitivitas tipe lambat/DTH dan hitung jumlah sel limfosit limpa, meskipun menunjukkan adanya peningkatan, namun secara statistik tidak bermakna.

5.2 Saran

Agar diperoleh sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan yang dapat meningkatkan aktivitas DTH dan jumlah sel limfosit secara bermakna, perlu dilakukan penelitian serupa dengan variasi dosis yang lebih tinggi. Selain itu, untuk melihat aktivitas imunostimulannya, dapat digunakan parameter-parameter yang lain yaitu titer antibodi, bersihan karbon, atau dengan menggunakan ELISA.

DAFTAR ACUAN

- Atal, C.K., Sharma, M.L., Kaul, A., & Khajuria, A. (1986). Immunomodulating agents of plant origin. I: preliminary screening. *J. of Ethnophar*, 18, 133-141.
- Baratawidjaja, K.G. (1996). *Imunologi Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bekierkunst, A., Yarkoni, E., Flechner, I., Morecki, S., Vilkas, E., & Lederer, E. (1971). Immune response to sheep red blood cells in mice pretreated with mycobacterial fractions. *Infection and Immunity*. 256-263.
- Elgert, K.D. (1996). *Immunology: understanding the immune system*. USA: Wiley-Liss, Inc.
- Fakeye, T.O., Pal, A., Bawankule, D.U., & Khanuja, S.P.S. (2008). Immunomodulatory effect of extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (family Malvaceae) in a mouse model. *Phy. res.*, 664-668.
- Farmakope Indonesia ed III*. (1979). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Farnsworth, N.R., & Bunyapraphatsara, N. (1992). *Thai medicinal plants: recommended for primary health care system*. Thailand: Mahidol University.
- Fasoyiro S.B., Ashaye O.A., Adeola A., & Samuel F.O. (2005). Chemical and storability of fruit-flavoured (*Hibiscus sabdariffa*) Drinks. *World J. of Agricultural Sci.*, 1, 2, 165-168.
- Hay, F.C., & Westwood, O.M.R. (2002). *Practical immunology 4th edition*. Britain: Blackwell Science.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia jilid III*. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan.
- Hybridoma Techniques. (2009). Preparation of lymphocyte cells suspension. June 1, 2010. <http://people.rit.edu/~gtfsbi/hytc/lymphocytes.htm>.
- Indrata, Frans. 2009. *Upaya pembuatan teh dari bunga rosella (Hibiscus sabdariffa) dan pegagan (Centella asiatica) sebagai sediaan antioksidan*. Tugas Akhir Sarjana Farmasi, Universitas Indonesia.
- Jones S.B., & Luchsinger, A.E. (1987). *Plant systematic*. Singapura: McGraw-Hill Book Company.

- Kresno, S.B. (2001). *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Morton, J. (1987). *Roselle. Fruits of warm climates*. Miami, FL: Julia F. Morton.
- Ogundipe, O.O., Moody, J.O., Oluwole, F.S., & Fakeye, T.O. (1998). Antiinflammatory and antimicrobial activities of selected Nigerian Plant foods. *In Proceedings of the 1st International Workshop on Herbal Medicinal Products. University of Ibadan: Ibadan*, 138–146.
- Prosea. (1999). *Plant resources of south Asia 12*. Bogor: Prosea Foundation.
- Punturee, K., Wild, C.P., Kasinrer, W., & Vinitketkumnuen, U. (2005). Immunomodulatory activities of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus* extracts. *Asian Pacific J. Cancer Prev*, 6, 396-400.
- Puri, A., Saxena, R., Saxena, R.P., & Saxena, K.C. (1993). Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. of Nat. Prod.*, 56, 7, 995-999.
- Qi, Y., Chin, K.L., Malekian, F., & Granger, J. (2005). Biological characteristics, nutritional and medicinal value of roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *Southern University Agricultural Research and Extension Center*, 604.
- Reanmongkol, W., & Itharat, A. (2007). Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces L. in experimental animals. *Songklanakarinn J. Sci. Tech.*, 29, 29-38.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., & Male, D. (1996). *Introduction to the immune system Immunology*, 4th ed. London: Mosby Co.
- Sasmito, E., Rumiayati, Rahayu, S., Andriyani, E., & Istikharah, R. (2006). Pengaruh pemberian susu kuda terfermentasi terhadap imunitas vaksin hepatitis A pada mencit Balb/c. *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(1), 13-19.
- Sharma, M.L., Singh, B., Chandan, B.K., Khajuria, A., Kaul, A., Bani, S., Banerjee, S.K., & Gambhir, S.S. (1996). Actions of some flavonoids on pefic and non-specific immune mechanisms. *Phytomed*, III(2), 191-195
- Spector, S., Munjal, I., & Schmidt, D.E. (1998). Effect of the immunostimulant, levamisole, on opiate withdrawal and levels of endogenous opiate alkaloids and monoamine neurotransmitters in rat brain. *Neuropsychophar*, 19 (5), 417-427.

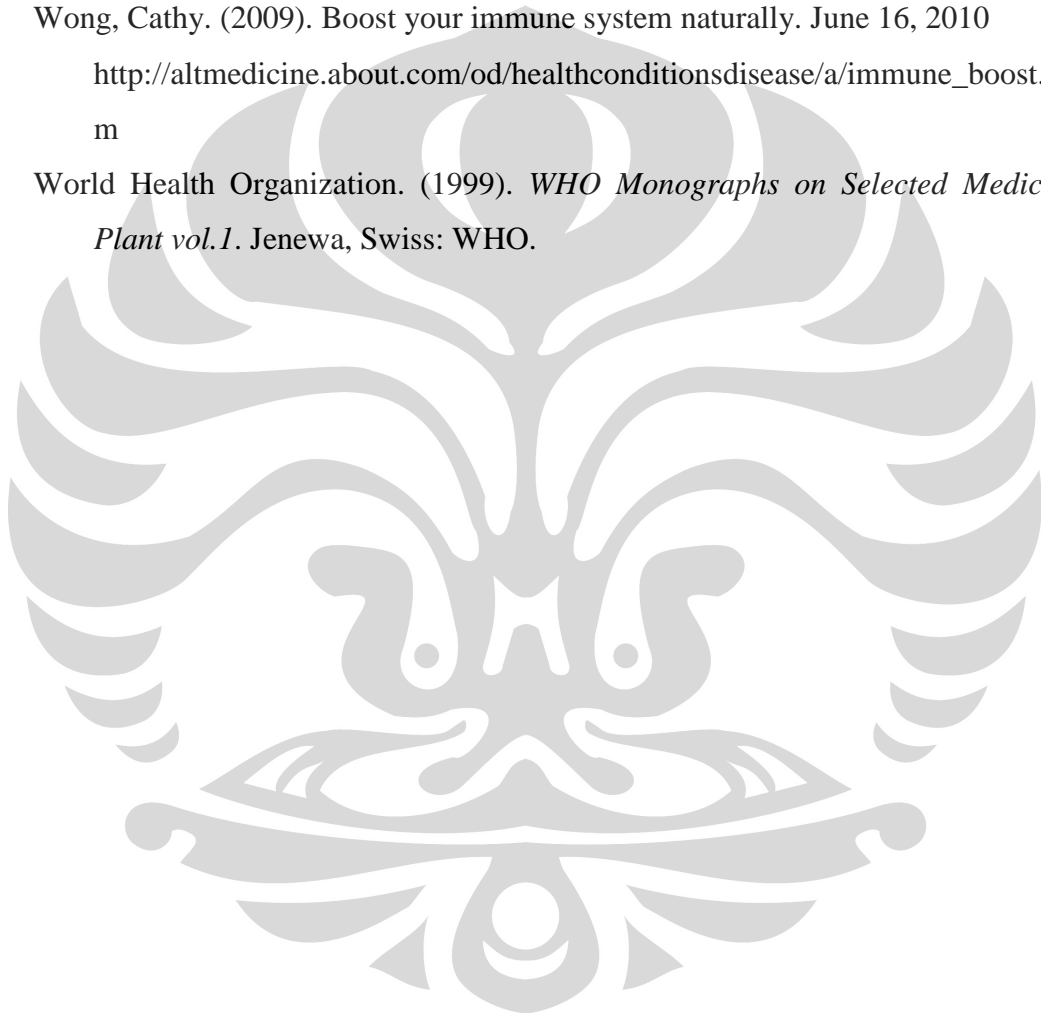
Sriningsih, Wibowo, A.E. (2008). Efek imunostimulan ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* L.) secara in vivo pada tikus. *J. Bahan Alam Indonesia* ISSN 1412-2855, 7, 1, 15-18.

Tang, W., & Eisenbrand, G. (1992). *Chinese drug of plant origin*. Berlin: Springer-Verlag.

Vademekum bahan obat alam. (1989). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Wong, Cathy. (2009). Boost your immune system naturally. June 16, 2010
http://altmedicine.about.com/od/healthconditionsdisease/a/immune_boost.htm

World Health Organization. (1999). *WHO Monographs on Selected Medicinal Plant vol.1*. Jenewa, Swiss: WHO.





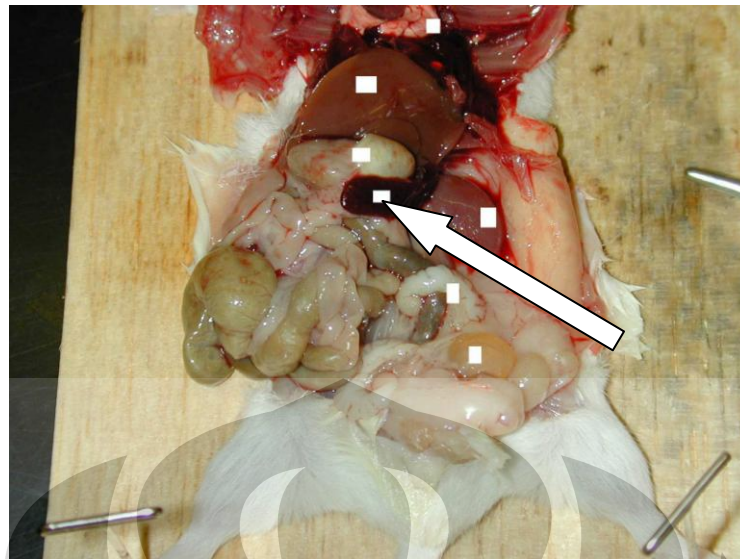
Gambar 2.1 Tanaman *Hibiscus sabdariffa* dan Kaliks Rosella



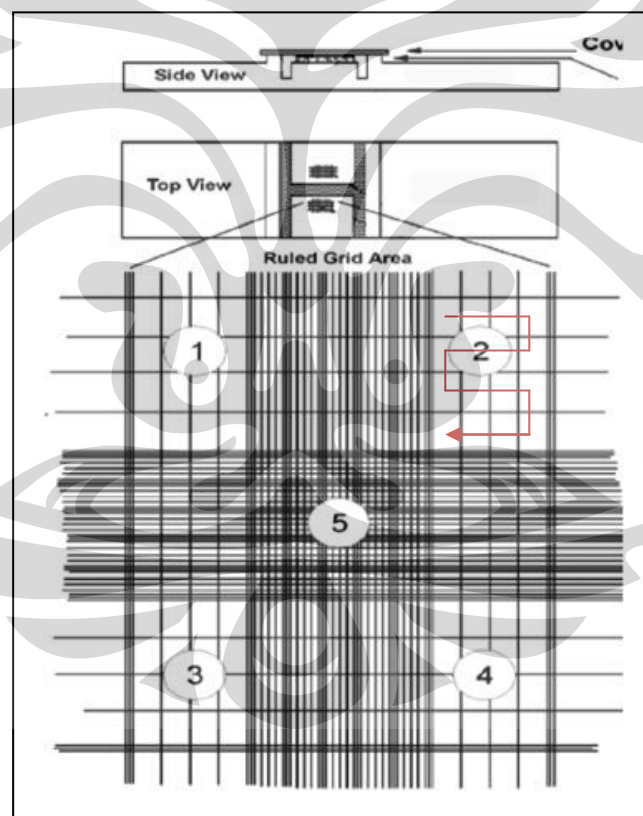
Gambar 2.2 Tanaman *Centella asiatica*



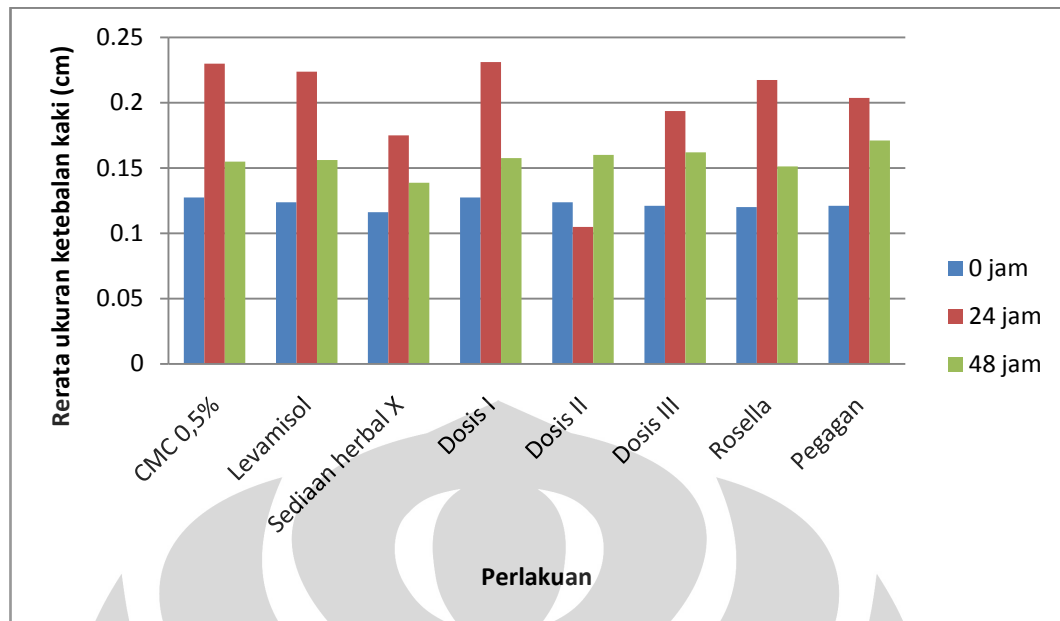
Gambar 3.1 Mencit galur ddY berumur 2-3 bulan



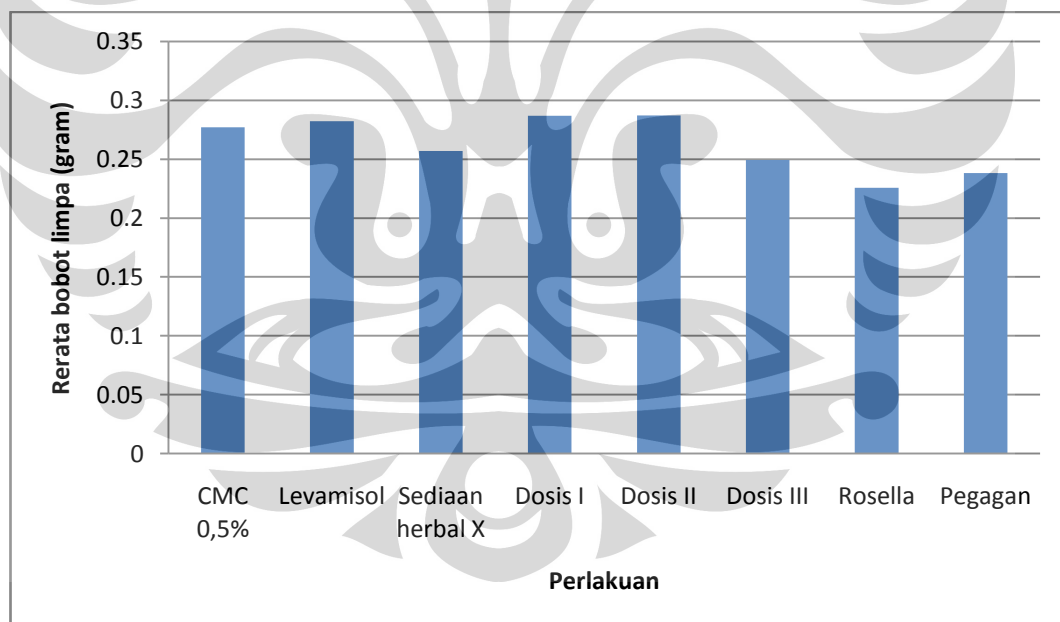
Gambar 3.2 Pembedahan mencit untuk pengambilan limpa



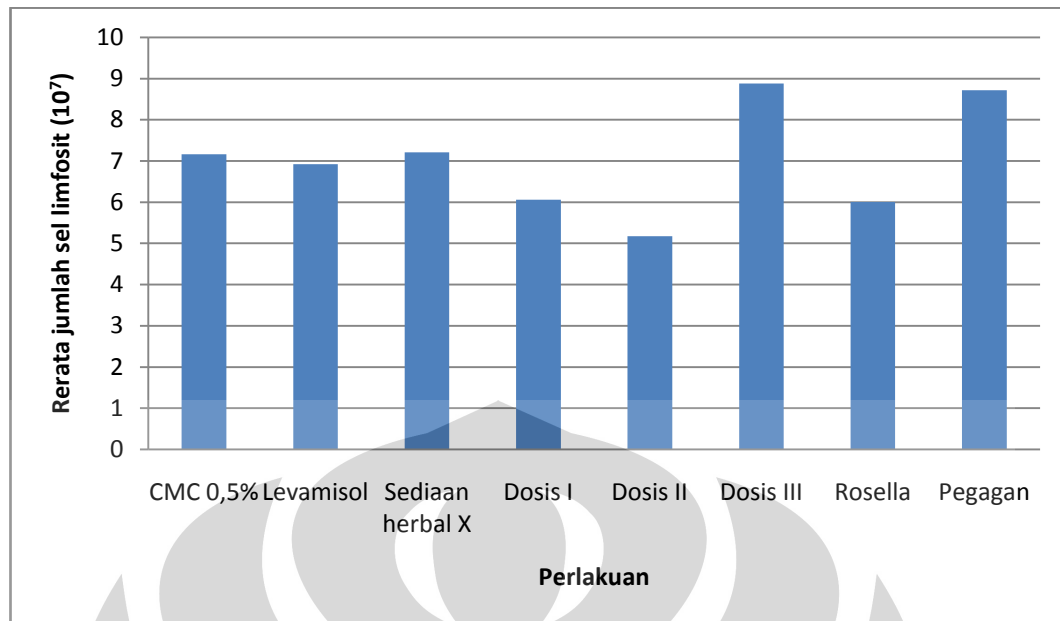
Gambar 3.3 Area penghitungan Hemositometer 1-4



Gambar 4.1 Diagram batang rerata ukuran ketebalan kaki mencit pada waktu sebelum tantangan, 24 jam dan 48 jam setelah tantangan



Gambar 4.2 Diagram batang rerata penimbangan bobot limpa mencit setelah tantangan



Gambar 4.3 Diagram batang rerata penghitungan jumlah sel limfosit limpa mencit setelah tantangan

Tabel 4.2 Hasil pengukuran ketebalan kaki mencit sebelum pemberian tantangan

Perlakuan	Ukuran ketebalan kaki mencit sebelum tantangan (cm)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	0,120	0,130	0,130	0,130
Pembanding I	0,120	0,115	0,125	0,135
Pembanding II	0,125	0,110	0,125	0,105
Dosis kombinasi I	0,120	0,135	0,125	0,130
Dosis kombinasi II	0,115	0,125	0,120	0,135
Dosis kombinasi III	0,120	0,130	0,125	0,110
Rosella	0,115	0,130	0,130	0,105
Pegagan	0,120	0,125	0,130	0,110

Tabel 4.3 Hasil pengukuran ketebalan kaki mencit pada jam ke-24 setelah pemberian tantangan

Perlakuan	Ukuran ketebalan kaki mencit pada jam ke-24 setelah tantangan (cm)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	0,205	0,250	0,240	0,225
Pembanding I	0,185	0,215	0,205	0,290
Pembanding II	0,180	0,155	0,180	0,185
Dosis kombinasi I	0,285	0,215	0,235	0,190
Dosis kombinasi II	0,220	0,205	0,225	0,170
Dosis kombinasi III	0,225	0,185	0,165	0,200
Rosella	0,235	0,190	0,225	0,220
Pegagan	0,245	0,190	0,180	0,200

Tabel 4.4 Hasil pengukuran ketebalan kaki mencit pada jam ke-48 setelah pemberian tantangan

Perlakuan	Ukuran ketebalan kaki mencit pada jam ke-48 setelah tantangan (cm)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	0,125	0,170	0,155	0,170
Pembanding I	0,170	0,125	0,145	0,185
Pembanding II	0,150	0,120	0,145	0,140
Dosis kombinasi I	0,160	0,160	0,160	0,150
Dosis kombinasi II	0,160	0,155	0,175	0,150
Dosis kombinasi III	0,168	0,165	0,155	0,160
Rosella	0,145	0,155	0,185	0,120
Pegagan	0,185	0,180	0,150	0,170

Tabel 4.7 Bobot badan mencit pada uji bobot limpa dan hitung sel limfosit limpa

Perlakuan	Bobot badan mencit (gram)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	28,7	28,8	19,1	21,1
Pembanding I	31,4	22,6	23,1	21,7
Pembanding II	25,0	22,7	23,1	13,4
Dosis kombinasi I	31,3	21,4	24,5	25,9
Dosis kombinasi II	31,6	32,0	25,2	24,3
Dosis kombinasi III	29,4	23,8	26,3	23,9
Rosella	28,3	23,2	26,1	21,5
Pegagan	27,9	21,3	25,2	30,3

Tabel 4.8 Hasil penimbangan bobot limpa

Perlakuan	Bobot limpa (gram)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	0,2424	0,3741	0,3200	0,1720
Pembanding I	0,3025	0,2463	0,1720	0,4090
Pembanding II	0,3150	0,4096	0,1920	0,1090
Dosis kombinasi I	0,4704	0,1774	0,1890	0,3110
Dosis kombinasi II	0,4703	0,2264	0,1730	0,2790
Dosis kombinasi III	0,2658	0,2475	0,2280	0,2560
Rosella	0,2192	0,2472	0,1530	0,2840
Pegagan	0,2007	0,1858	0,1680	0,3980

Tabel 4.9 Hasil penghitungan jumlah sel limfosit limpa

Perlakuan	Jumlah sel limfosit limpa/g limpa (10^7)			
	1	2	3	4
Kontrol negatif	10,675	7,050	4,175	6,755
Pembanding I	7,850	10,095	7,250	2,505
Pembanding II	5,630	4,665	4,220	14,330
Dosis kombinasi I	4,435	6,600	6,300	6,910
Dosis kombinasi II	4,860	4,970	5,055	5,810
Dosis kombinasi III	9,875	11,880	3,945	9,810
Rosella	6,840	6,825	4,655	5,720
Pegagan	11,085	11,435	8,900	3,455

Lampiran 1 Penetapan Dosis

Dosis seduhan teh yang biasa digunakan masyarakat adalah 3 gram per kantung teh dengan air panas sebanyak 200 ml. Faktor konversi dari manusia ke mencit, yaitu 0,0026 dan faktor farmakokinetika adalah 10, maka dosis sediaan uji untuk mencit didapat dengan mengalikan faktor-faktor tersebut dengan dosis untuk manusia yaitu 3 gram per hari. Dosis ini kemudian akan ditetapkan sebagai dosis terendah yang akan diberikan. Sedangkan penentuan dosis berikutnya merupakan kelipatan dua dari dosis terendah. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap tiga macam dosis yaitu dosis I (dosis yang digunakan manusia), dosis II ($2 \times$ dosis I), dan dosis III ($4 \times$ dosis I). Setiap kantung teh berisi kombinasi serbuk kaliks rosella dan herba pegagan dengan perbandingan 1:9 (0,3 gram rosella dan 2,7 gram pegagan).

Berikut ini perhitungan dosis yang akan diberikan:

1. Dosis kombinasi rosella dan pegagan :

$$\text{Dosis rosella} : 0,3 \times 0,0026 \times 10 = 0,0078 \text{ g/20 g bb mencit}$$

$$\text{Dosis pegagan} : 2,7 \times 0,0026 \times 10 = 0,0702 \text{ g/20 g bb mencit}$$

Maka variasi dosis yang digunakan, yaitu:

- Dosis 1 $= 0,0078 \text{ g} + 0,0702 \text{ g}$
 $= 0,078 \text{ g/ 20 g bb mencit}$
- Dosis 2 (2^1) $= 2 (0,0078) \text{ g} + 2 (0,0702) \text{ g}$
 $= 0,0156 \text{ g} + 0,1404 \text{ g}$
 $= 0,156 \text{ g/ 20 g bb mencit}$
- Dosis 3 (2^2) $= 4 (0,0078) \text{ g} + 4 (0,0702) \text{ g}$
 $= 0,0312 \text{ g} + 0,2808 \text{ g}$
 $= 0,312 \text{ g/ 20 g bb mencit}$

2. Untuk masing-masing simplisia rosella dan pegagan, dosisnya dihitung sebagai berikut:

- Dosis rosella : $0,3 \times 0,0026 \times 10 = 0,0078 \text{ g}/20 \text{ g bb mencit}$
- Dosis pegagan : $2,7 \times 0,0026 \times 10 = 0,0702 \text{ g}/20 \text{ g bb mencit}$

3. Dosis kontrol positif sediaan cair herba X :

Dosis manusia untuk sehari = 20 ml setara dengan 150 mg herba X

Dosis manusia dikalikan faktor konversi dan faktor farmakokinetik, diperoleh dosis untuk mencit, yaitu:

$$\begin{aligned} \text{Dosis mencit untuk sehari} &= 100 \text{ mg} \times 0,0026 \times 10 = 2,6 \text{ mg}/20 \text{ gBB} \\ &= 0,0039 \text{ g}/20 \text{ gBB} \end{aligned}$$

4. Dosis kontrol positif levamisol :

Dosis untuk mencit sehari = $0,45 \text{ mg}/20 \text{ g bb mencit}$

$$= 0,00045 \text{ g}/20 \text{ gBB mencit}$$

Lampiran 2
Perhitungan Larutan Uji

1. Larutan uji sediaan teh kombinasi kaliks rosella dan herba pegagan

Volume bahan uji yang diberikan pada mencit sebanyak 0,5 ml/20 g bb mencit. Mencit yang akan digunakan sebanyak 32 ekor yang terbagi dalam 8 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit.

Maka jumlah yang diberikan untuk 4 ekor mencit selama 7 hari, yaitu:

$$\text{Dosis III} = 0,5 \text{ ml} \times 4 \text{ ekor} \times 7 \text{ hari} = 14 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis II} &= 0,5 \text{ Dosis III} \times 14 \text{ ml} \\ &= 7 \text{ ml (Dosis III diambil sebanyak 7 ml dan dicukupkan hingga 14 ml dengan CMC 0,5\%)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis I} &= 0,25 \text{ Dosis III} \times 14 \text{ ml} \\ &= 3,5 \text{ ml (Dosis III diambil sebanyak 3,5 ml dan dicukupkan hingga 14 ml dengan CMC 0,5\%)} \end{aligned}$$

Volume sediaan teh yang dibutuhkan selama 7 hari:

$$\text{Volume sediaan teh} = 14 + 7 + 3,5 = 24,5 \text{ mL} \sim 30 \text{ ml}$$

Dari 200 ml seduhan teh kombinasi rosella dan pegagan akan memperoleh:

$$\text{Dosis I} : 200 \text{ ml} \times 0,0026 \times 10 = 5,2 \text{ ml}$$

$$\text{Dosis II} : 2 \times 5,2 \text{ ml} = 10,4 \text{ ml}$$

$$\text{Dosis III} : 4 \times 5,2 \text{ ml} = 20,8 \text{ ml}$$

Maka serbuk kombinasi rosella dan pegagan yang dibutuhkan:

$$\frac{20,8 \text{ ml}}{x \text{ ml}} = \frac{0,5 \text{ ml}}{30 \text{ ml}} \longrightarrow x = 1248 \text{ ml} \sim 1400 \text{ ml}$$

$$\longrightarrow 21 \text{ g (7 kantung teh)}$$

$$\longrightarrow 2,1 \text{ g rosella} + 18,9 \text{ g pegagan}$$

1400 mL teh kombinasi rosella dan pegagan dosis III yang telah dibuat kemudian diuapkan hingga membentuk ekstrak kental. Setelah itu ekstrak kental yang didapat dicukupkan volumenya dengan larutan CMC 0,5% hingga menjadi:

$$\frac{20,8 \text{ ml}}{1400 \text{ ml}} = \frac{0,5 \text{ ml}}{x \text{ ml}} \longrightarrow x = 33,65 \text{ ml}$$

2. Larutan uji sediaan teh kaliks rosella

Dosis mencit = $0,3 \text{ g} \times 0,0026 \times 10 = 0,0078 \text{ g}/20 \text{ g}$ bb mencit

Diseduh dengan air sebanyak = $200 \text{ ml} \times 0,0026 \times 10 = 5,2 \text{ ml}/20\text{g}$ bb mencit

Volume sediaan teh rosella yang diberikan ke 4 mencit selama 7 hari:

Volume sediaan teh = $4 \times 7 \times 0,5 \text{ ml} = 14 \text{ ml}$

Jumlah simplisia yang dibutuhkan yaitu:

$$\frac{5,2 \text{ ml}}{x \text{ ml}} = \frac{0,5 \text{ ml}}{14 \text{ ml}} \longrightarrow x = 145,6 \text{ ml} \sim 200 \text{ ml}$$

→ 3 g (1 kantung teh)

→ 0,3 g rosella

200 ml teh yang telah dibuat kemudian diuapkan hingga menjadi ekstrak kental. Kemudian dicukupkan volumenya dengan larutan CMC 0,5% hingga 19,23 ml

$$\frac{5,2 \text{ ml}}{200 \text{ ml}} = \frac{0,5 \text{ ml}}{x \text{ ml}} \longrightarrow x = 19,23 \text{ ml}$$

3. Larutan uji sediaan teh herba pegagan

Dosis mencit = $2,7 \text{ g} \times 0,0026 \times 10 = 0,0078 \text{ g}/20 \text{ g}$ bb mencit

Diseduh dengan air sebanyak = $200 \text{ ml} \times 0,0026 \times 10 = 5,2 \text{ ml}/20\text{g}$ bb mencit

Volume sediaan teh pegagan yang diberikan ke 4 mencit selama 7 hari:

Volume sediaan teh = $4 \times 7 \times 0,5 \text{ ml} = 14 \text{ ml}$

Jumlah simplisia yang dibutuhkan yaitu:

$$\frac{5,2 \text{ ml}}{x \text{ ml}} = \frac{0,5 \text{ ml}}{14 \text{ ml}} \longrightarrow x = 145,6 \text{ ml} \sim 200 \text{ ml}$$

→ 3 g (1 kantung teh)

→ 0,3 g pegagan

200 ml teh yang telah dibuat kemudian diuapkan hingga menjadi ekstrak kental. Kemudian dicukupkan volumenya dengan larutan CMC 0,5% hingga 19,23 ml

$$\frac{5,2 \text{ ml}}{200 \text{ ml}} = \frac{0,5 \text{ ml}}{x \text{ ml}} \quad \longrightarrow \quad x = 19,23 \text{ ml}$$

4. Larutan Uji Levamisol

Dosis untuk mencit yaitu: 0,45 mg/ 20 g bb mencit

Volume larutan untuk 4 mencit selama 7 hari adalah:

$$\text{Volume larutan} = 0,7 \times 4 \times 7 = 19,6 \text{ ml}$$

Serbuk levamisol yang dibutuhkan:

$$\text{Jumlah yang ditimbang} = 0,45 \times 4 \times 7 = 12,6 \text{ mg}$$

Serbuk levamisol yang telah ditimbang sebanyak 12,6 mg dilarutkan dalam CMC 0,5% sebanyak 19,6 ml.

5. Sediaan Cair Herba X

Dosis manusia = 20 mL/ hari

$$\text{Dosis untuk mencit} = 20 \text{ mL} \times 0,0026 \times 10 = 0,52 \text{ mL}/20 \text{ g bb mencit}$$

Larutan uji yang disondekan ke mencit dikonversikan sesuai dengan berat badan mencit.

Lampiran 3
 Determinasi Tanaman Rosela dan Pegagan



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, 7 April 2010

Nomor : 471/IPH.1.02/If.8/IV/2010
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Dwitya Andarwati
 Mhs. UI Npm : 0606071052)
 Jl. Tebet Barat Dalam 1A/9


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	Sampel 6	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Apiaceae
2	Sampel 7	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Malvaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


 Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
 NIP. 195111041975011001

Lampiran 4
 Uji Distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap Data Ukuran Ketebalan Kaki pada
 24 jam Setelah Tantangan
 (SPSS 15.0)

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data ukuran ketebalan kaki mencit terdistribusi normal atau tidak

Hipotesis : Ho = data ukuran ketebalan kaki terdistribusi normal
 Ha = data ukuran ketebalan kaki tidak terdistribusi normal

α : 0,05

Daerah kritis : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$

Hasil : Nilai signifikansi kelima kelompok $> \alpha$

Kesimpulan : Ho diterima sehingga data terdistribusi normal

Hasil uji normalitas

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikansi
I	0,971	4	0,850
II	0,863	4	0,269
III	0,773	4	0,062
IV	0,967	4	0,823
V	0,878	4	0,329
VI	0,997	4	0,989
VII	0,897	4	0,414
VIII	0,870	4	0,296

Lampiran 5

Uji Homogenitas Varian Levene terhadap Data Ukuran Ketebalan Kaki pada 24 jam Setelah Tantangan
(SPSS 15.0)

- Tujuan : Untuk mengetahui homogenitas variansi data ukuran ketebalan kaki
- Hipotesis : Ho = data ukuran ketebalan kaki variansi homogen
Ha = data ukuran ketebalan kaki tidak variansi homogen
- α : 0,05
- Daerah kritis : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$
- Hasil : Nilai signifikansi = 0,199 $> \alpha$
- Kesimpulan : Ho diterima sehingga data bervariasi homogen

Hasil uji homogenitas

Levene Statistik	df1	df2	Signifikansi
0,935	7	24	0,498

Lampiran 6

Uji Analisis Varian Satu Arah terhadap Data Ukuran Ketebalan Kaki pada 24 jam
Setelah Tantangan
(SPSS 15.0)

- Tujuan : Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada data ukuran ketebalan kaki antar kelompok perlakuan
- Hipotesis : H_0 = data ukuran ketebalan kaki antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna
 H_a = data ukuran ketebalan kaki antar kelompok perlakuan berbeda secara bermakna
- Statistik Uji : Uji F
- α : 0,05
- Daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$
- Hasil : Nilai signifikansi = 0,221 $> \alpha$
- Kesimpulan : H_0 diterima sehingga data urea plasma antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Hasil ANAVA satu arah

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Signifikansi
Antar kelompok	0,011	7	0,002	1,795	0,135
Dalam kelompok	0,020	24	0,001		
Total	0,031	31			

Lampiran 7

Uji Distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap Data Ukuran Ketebalan Kaki pada
48 jam Setelah Tantangan
(SPSS 15.0)

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data ukuran ketebalan kaki terdistribusi normal atau tidak

Hipotesis : Ho = data ukuran ketebalan kaki terdistribusi normal
Ha = data ukuran ketebalan kaki tidak terdistribusi normal

α : 0,05

Daerah kritis : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$

Hasil : Nilai signifikansi kelima kelompok $> \alpha$

Kesimpulan : Ho ditolak sehingga data tidak terdistribusi normal

Hasil uji normalitas

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikansi
I	0,827	4	0,161
II	0,973	4	0,857
III	0,887	4	0,369
IV	0,630	4	0,001
V	0,927	4	0,577
VI	0,973	4	0,861
VII	0,990	4	0,957
VIII	0,920	4	0,538

Lampiran 8

Uji Homogenitas Varian Levene terhadap Data Ukuran Ketebalan Kaki pada 48 jam Setelah Tantangan
(SPSS 15.0)

Tujuan : Untuk mengetahui homogenitas variansi data ukuran ketebalan kaki

Hipotesis : Ho = data ukuran ketebalan kaki variansi homogen

Ha = data ukuran ketebalan kaki tidak variansi homogen

α : 0,05

Daerah kritis : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$

Hasil : Nilai signifikansi = 0,199 $> \alpha$

Kesimpulan : Ho diterima sehingga data bervariasi homogen

Hasil uji homogenitas

Levene Statistik	df1	df2	Signifikansi
1,922	7	24	0,110

Lampiran 9

Uji Analisis Varian Satu Arah terhadap Data Ukuran Ketebalan Kaki pada 48 jam
Setelah Tantangan
(SPSS 15.0)

- Tujuan : Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada data ukuran ketebalan kaki antar kelompok perlakuan
- Hipotesis : Ho = data ukuran ketebalan kaki antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna
Ha = data ukuran ketebalan kaki antar kelompok perlakuan berbeda secara bermakna
- Statistik Uji : Uji F
- α : 0,05
- Daerah kritis : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$
- Hasil : Nilai signifikansi = 0,221 $> \alpha$
- Kesimpulan : Ho diterima sehingga data urea plasma antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Hasil ANAVA satu arah

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Signifikansi
Antar kelompok	0,002	7	0,000	1,123	0,381
Dalam kelompok	0.007	24	0,000		
Total	0,010	31			

Lampiran 10
 Uji Distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap Data Bobot Limpa Relatif
 (SPSS 15.0)

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data bobot limpa mencit terdistribusi normal atau tidak

Hipotesis : H_0 = data bobot limpa terdistribusi normal
 H_a = data bobot limpa tidak terdistribusi normal

α : 0,05

Daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$

Hasil : Nilai signifikansi kelima kelompok $> \alpha$

Kesimpulan : H_0 diterima sehingga data terdistribusi normal

Hasil uji normalitas

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikansi
I	0,883	4	0,352
II	0,873	4	0,312
III	0,871	4	0,301
IV	0,789	4	0,083
V	0,878	4	0,330
VI	0,780	4	0,071
VII	0,977	4	0,884
VIII	0,853	4	0,238

Lampiran 11
 Uji Homogenitas Varian Levene terhadap Data Bobot Limpa Relatif
 (SPSS 15.0)

Tujuan : Untuk mengetahui homogenitas variansi data bobot limpa

Hipotesis : H_0 = data bobot limpa variansi homogen

H_a = data bobot limpa tidak variansi homogen

α : 0,05

Daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$

Hasil : Nilai signifikansi = 0,199 $> \alpha$

Kesimpulan : H_0 diterima sehingga data bervariasi homogen

Hasil uji homogenitas

Levene Statistik	df1	df2	Signifikansi
0,456	7	24	0,856

Lampiran 12
 Uji Analisis Varian Satu Arah terhadap Data Bobot Limpa Relatif
 (SPSS 15.0)

- Tujuan : Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada data bobot limpa antar kelompok perlakuan
- Hipotesis : H_0 = data bobot limpa antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna
 H_a = data bobot limpa antar kelompok perlakuan berbeda secara bermakna
- Statistik Uji : Uji F
- α : 0,05
- Daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$
- Hasil : Nilai signifikansi = 0,221 $> \alpha$
- Kesimpulan : H_0 diterima sehingga data urea plasma antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Hasil ANAVA satu arah

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Signifikansi
Antar kelompok	0,352	7	0,050	0,345	0,925
Dalam kelompok	3,499	24	0,146		
Total	3,851	31			

Lampiran 13
 Uji Distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap Data Jumlah Sel Limfosit
 (SPSS 15.0)

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data jumlah sel limfosit menciit terdistribusi normal atau tidak

Hipotesis : Ho = data jumlah sel limfosit terdistribusi normal
 Ha = data jumlah sel limfosit tidak terdistribusi normal

α : 0,05

Daerah kritis : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$

Hasil : Nilai signifikansi kelima kelompok $> \alpha$

Kesimpulan : Ho ditolak sehingga data tidak terdistribusi normal

Hasil uji normalitas

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikansi
I	0,951	4	0,724
II	0,925	4	0,566
III	0,737	4	0,029
IV	0,826	4	0,157
V	0,680	4	0,007
VI	0,848	4	0,220
VII	0,868	4	0,289
VIII	0,840	4	0,195

Lampiran 14
 Uji Homogenitas Varian Levene terhadap Data Jumlah Sel Limfosit
 (SPSS 15.0)

- Tujuan : Untuk mengetahui homogenitas variansi data data jumlah sel limfosit
- Hipotesis : Ho = data jumlah sel limfosit variansi homogen
 Ha = data jumlah sel limfosit tidak variansi homogen
- α : 0,05
- Daerah kritis : Ho ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$
- Hasil : Nilai signifikansi = 0,199 $> \alpha$
- Kesimpulan : Ho diterima sehingga data bervariasi homogen

Hasil uji homogenitas

Levene Statistik	df1	df2	Signifikansi
1,834	7	24	0,27

Lampiran 15
Uji Analisis Varian Satu Arah terhadap Data Jumlah Sel Limfosit
(SPSS 15.0)

- Tujuan : Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada data jumlah sel limfosit antar kelompok perlakuan
- Hipotesis : H_0 = data jumlah sel limfosit antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna
 H_a = data jumlah sel limfosit antar kelompok perlakuan berbeda secara bermakna
- Statistik Uji : Uji F
- α : 0,05
- Daerah kritis : H_0 ditolak jika nilai signifikansi $< \alpha$
- Hasil : Nilai signifikansi = 0,221 $> \alpha$
- Kesimpulan : H_0 diterima sehingga data urea plasma antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

Hasil ANAVA satu arah

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Signifikansi
Antar kelompok	47.001	7	6,714	0,790	0,603
Dalam kelompok	204,067	24	8,503		
Total	251.067	31			

Lampiran 16

Analisis Uji Kruskal Wallis Terhadap Data Jumlah Sel Limfosit
(SPSS 15.0)

Tujuan : Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna pada data jumlah sel limfosit mencit

Hipotesa : H_0 = data jumlah sel limfosit mencit antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

H_a = data jumlah sel limfosit mencit antar kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

Signifikansi (α) : 0,05

Kriteria pengujian:

Jika nilai signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

Jika nilai signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak

Hasil uji Kruskal Wallis

	kadar
Chi-Square	4,301
df	7
Asymp. Sig.	0,745

Nilai signifikansi jumlah sel limfosit = 0,825; maka H_0 diterima

Kesimpulan:

Data jumlah sel limfosit mencit antar kelompok tidak berbeda secara bermakna