

EFEK IMUNOMODULATOR DARI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) DAN RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) TERHADAP PROLIFERASI SEL LIMFOSIT MENCIT Balb/c SECARA *IN VITRO*

IMMUNOMODULATOR EFFECT OF COMBINATION OF *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees HERB AND GINGER RHIZOME (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) ETHANOLIC EXTRACT ON CELL PROLIFERATION OF Balb/c MICE LYMPHOCYTES IN VITRO

Damriati Azimah, Yuswanto dan Wahyono, Djoko Santosa, dan Erna Prawita Setyowati
Department of Biology, Faculty of Pharmacy. Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara 55281, Yogyakarta.

ABSTRACT

Our susceptibility to various infectious diseases can be avoided by increasing the specific immune responses either by the proliferation of lymphocytes. Immunomodulator effect of Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees and Curcuma xanthorrhiza Roxb have been well evaluated. Empirically, the East Borneo's tribe combined both herbs to treat jaundice disease. However, scientific evidence is still needed in their use as a drug candidate. This study explores further effect of the immunomodulator from 5 ethanol extract groups. Quantitative analysis was also completed using a densitometer to obtain andrographolide and curcumin levels of ethanol extract. Lymphocyte proliferation was tested by using MTT colorimetric method, the results was read by an ELISA reader and statistically analyzed with One-Way ANOVA test with 95 % of confidence level. The maceration yield of sambiloto ethanol extract (EES) and temulawak ethanol extract (EET) were respectively 5.78 % w / w and 3.92 % w / w. The results of quantitative analysis in 28.6 mg EES contained 11.43 % andrographolide and from the 251.8 mg EET contained 28.79 % curcumin. From the MTT test, all treatment groups were significantly different from the control group. Based on the OD values, the best combination to increase lymphocyte cell proliferation ETS was a group contained 56.25 mg of temulawak and 18.75 mg of sambiloto in 1 ml of solvent. Nonetheless, the value was not higher than the ability of ET in increasing cell proliferation.

Keywords : *Imunomodulator, Sambiloto, Temulawak, TLC, Lymphocyte Proliferation*

ABSTRAK

*Kerentanan tubuh terhadap berbagai penyakit infeksi dapat dihindari dengan meningkatkan respon imun spesifik salah satunya dengan proliferasi sel limfosit. Efek immunomodulator telah teruji baik pada sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) maupun temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Secara empiris, masyarakat Kalimantan Timur mengobati penyakit kuning dengan kombinasi kedua tanaman. Meskipun begitu, bukti ilmiah masih sangat diperlukan dalam pemanfaatannya sebagai obat. Penelitian ini mengeksplorasi lebih lanjut kemampuan daya immunomodulator dari lima kelompok ekstrak etanol. Analisis kuantitatif dilakukan menggunakan densitometer untuk mendapatkan kadar andrografolid dan kurkumin dari ekstrak etanol. Uji proliferasi limfosit menggunakan kolorimetri metode MTT dan dianalisis secara statistik dengan uji One-Way ANOVA dalam taraf kepercayaan 95 %. Hasil analisis kuantitatif dalam 28,6 mg ekstrak kental etanol sambiloto (EES) mengandung 11,43 % andrografolid dan dalam 251,8 mg ekstrak kental temulawak (EET) mengandung 28,79 % kurkumin. Uji MTT semua kelompok perlakuan berbeda signifikan dari kelompok kontrol. Berdasarkan nilai OD, kombinasi terbaik dalam peningkatan proliferasi sel limfosit ialah kelompok ETS yang mengandung 56,25 mg temulawak dan 18,75 mg sambiloto dalam 1 mL pelarut. Namun nilai tersebut ternyata tidak lebih tinggi dari kemampuan ET dalam meningkatkan proliferasi sel.*

Kata kunci : *Imunomodulator, Sambiloto, Temulawak, KLT, Proliferasi Limfosit*

Corresponding author: Wahyono
E-mail: wahyonoug@yahoo.com

PENDAHULUAN

Kesembuhan seseorang dari penyakit yang dikarenakan oleh virus, bakteri, ataupun antigen lain yang memicu terjadinya reaksi pada tubuh, bergantung pada sistem kekebalan tubuh itu sendiri. Sebagai respon, tubuh akan menaikkan sistem pertahanan tubuh yang dapat pula dipicu dengan memberikan senyawa yang disebut imunomodulator. Hal ini akan menyebabkan produksi limfosit meningkat pesat dan sel limfosit B akan mensekresikan antibodi dengan afinitas yang lebih tinggi terhadap antigen jika dibandingkan dengan paparan antigen pertama (Delves & Roitt, 2000).

Penggunaan tanaman sebagai obat telah dilakukan sejak dahulu di Indonesia. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dan Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees) sangat bermanfaat secara turun-menurun dalam meningkatkan daya tahan dan stamina tubuh (Chao & Lin, 2010; (Trubus, 2010). Didukung dengan data empiris, masyarakat Kalimantan Timur menggunakan campuran temulawak dan sambiloto bersamaan dengan tambahan beberapa tanaman lain sebagai ramuan untuk meringankan sakit kuning (Badan POM RI, 2011). Berdasarkan penelitian sebelumnya, Andrografolid, 14-deoksi-11,12-didehidroandrografolid, dan 14-deoksiandrografolid pada sambiloto pun berperan sebagai imunomodulator dengan meningkatkan proliferasi sel limfosit (Spelman *et al.*, 2006; Chao & Lin, 2010). Sedangkan, kurkuminoid yang juga terkandung dalam temulawak memiliki aktivitas sebagai imunomodulator dengan meningkatkan sintesis antibodi (Bermawie *et al.*, 2006). Penelitian lain mengemukakan bahwa campuran ekstrak etanol dari kombinasi *Curcuma xanthorrhiza*, *Phyllanthus niruri*, *Andrographis paniculata*, dan *Curcuma aeruginosa* menunjukkan bahwa kombinasi (1:1:1:1) memberi nilai antioksidan dan aktivitas biologis tertinggi (Kurniawan, 2011).

Menurut Widiyanto (1987), aktivitas suatu senyawa yang dapat merangsang sistem imun tidak tergantung pada ukuran molekul tertentu. Efek ini dapat diberikan baik oleh senyawa dengan berat molekul yang kecil maupun oleh senyawa polimer. Dengan demikian, serangkaian uji imunobiologi baik *in vivo* maupun *in vitro*, termasuk uji proliferasi sel dilakukan terhadap ekstrak temulawak, ekstrak sambiloto, dan kombinasi keduanya. Uji proliferasi sel bertujuan untuk melihat hingga sejauh mana pengaruh senyawa yang terkandung dalam kombinasi ekstrak tersebut mampu memberikan respon imun lebih tinggi daripada senyawa tunggal.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan: herba sambiloto kering dan rimpang temulawak kering yang didapatkan dari CV. Indmira jalan Kaliurang km 18,5 Yogyakarta, etanol 70 %, kloroform p.a, metanol p.a, *silica gel* 60 F₂₅₄, etanol p.a, asam asetat glasial p.a, andrografolid 0,1 % ^{b/v} 36,564.5-100MG (Sigma) dengan kemurnian 98 %, kurkumin 1 % ^{b/v} c1386-10G (Sigma) dengan kemurnian 65 hingga 70 %, anisaldehyda asam sulfat, limpa dari mencit jantan Balb/c, kloroform 70 %, media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Gibco), medium komplet RPMI 1640 (Gibco), FBS 10 % ^{v/v} (Gibco), PBS, *buffer* lisis (NH₄CL), DMSO, penisilin - streptomisin 1 % ^{v/v}, fungison 0,5 % ^{v/v} (Sigma), FBS 10 % ^{v/v}, PHA (Invitrogen), MTT 0,003 % ^{b/v} (Sigma), SDS 10 % (Stopper) dalam asam klorida 0,01 N, dan hewan uji mencit jantan galur Balb/c berumur ± 2 bulan yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit II Universitas Gadjah Mada.

Alat yang digunakan: alat gelas, seperangkat alat uji kromatografi lapis tipis, densitometer (CAMAG TLC Scanner 3), Spuit injeksi 1 mL (Terumo), jarum 19G berujung runcing, neraca analitik dengan kepekaan 0,01 (Mettler Toledo), ELISA *reader* hemositometer, inkubator CO₂ 5 % 37° C (Mermed), seperangkat alat komputer dan software SPSS.

Jalannya Penelitian

Identifikasi Herba Sambiloto dan Rimpang Temulawak

Identifikasi dilakukan terkait dengan kebenaran bahan yang akan digunakan. Proses identifikasi dari herba sambiloto dan rimpang temulawak dilakukan di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

Pembuatan Ekstrak Kental

Penyarian senyawa pada serbuk simplisia kering sambiloto dan temulawak dilakukan dengan metode maserasi dengan etanol 70 % dengan perbandingan serbuk: cairan penyari (1:7) selama 5 hari dan proses remaserasi satu kali. Pelarut diuapkan dari maserat hasil penyarian diatas penangas air hingga diperoleh konsistensi kental. Rendemen dinyatakan dalam persen bobot per bobot (% ^{b/b}).

Analisis Fitokimia Ekstrak

Ekstrak etanol sambiloto dan temulawak masing-masing diambil dan dilarutkan menggunakan etanol p.a dalam flakon terpisah.

Persen kadar ekstrak etanol sambiloto (EES) dan ekstrak etanol temulawak (EET) yang digunakan untuk uji KLT ialah 1,14 % b/v dan 10,07 % b/v .

Dalam uji KLT standard perbandingan yang digunakan adalah andrografolid 0,1 % b/v untuk sambiloto dan kurkumin 1 % b/v untuk temulawak. Larutan yang telah disiapkan beserta standarnya, ditotolkan pada lempeng *silica gel* 60 F₂₅₄ dengan fase gerak kloroform : metanol (9:1) v/v untuk sambiloto dan kloroform : etanol : asam asetat glasial (94:2,5:0,5) v/v untuk temulawak. Penotolan dilakukan berseri yaitu 2 μ L, 4 μ L, dan 6 μ L untuk andrografolid sebagai perbandingan sementara ekstrak etanol sambiloto 3 μ L. Begitu pula pada temulawak, penotolan dilakukan berseri untuk larutan standar perbandingan kurkumin dengan volume 0,5 μ L, 1 μ L, dan 3 μ L serta volume sampel 1 μ L. Uji direplikasi sebanyak 3 kali.

Kedua profil kromatografi dari masing-masing ekstrak etanol akan dideteksi dengan sinar tampak, UV 254 nm, dan UV 366 nm. Pembacaan menggunakan *TLC scanner* atau densitometer pada panjang gelombang 232 nm untuk ekstrak etanol sambiloto, sedangkan analisis densitometri ekstrak etanol temulawak dideteksi pada panjang gelombang 422 nm. Untuk mendapatkan analisis yang lebih kuat lagi dan mendeteksi senyawa terpenoid baik dari ekstrak etanol sambiloto maupun temulawak dilakukan penyemprotan pada plat KLT keduanya dengan anisaldehid asam sulfat. Sebelum dan setelah penyemprotan diukur *hRf* tiap bercak pada masing-masing plat kromatogram pada pengamatan cahaya tampak, UV 254 nm, maupun UV 366 nm.

Pembuatan Stok Sel Limfosit dari Limpa Mencit Balb/c

Isolasi organ limpa pertama-tama dengan mengorbankan mencit jantan Balb/c dengan pemberian kloroform. Mencit yang telah dikorbankan kemudian ditelentangkan dan dibasahi pada bagian dada dengan alkohol 70 % untuk mensterilkan dan mengurangi kemungkinan kontaminasi. Setelah itu, bagian perut sampai dada dibuka dengan gunting bedah, ambil limpa menggunakan *forcep* dan tarik perlahan lalu potong. Limpa diletakkan dalam gelas petri steril dengan menambahkan 3-5 ml media RPMI 1640. Suntik RPMI 1640 ke bagian dalam limpa, ambil cairan di dalamnya, suntik kembali pada limpa lalu ambil, lakukan suntik-ambil sampai limpa berwarna transparan. Tekan limpa berkali-kali dengan ujung *syringe* hingga semua isi limpa keluar. Sisihkan jaringan atau gumpalan dengan mengambil dan mengeluarkan suspensi ke dalam *syringe* yang dilengkapi dengan jarum 19G,

lalu masukkan suspensi ke dalam *microtube* steril. Ulangi lagi pada sisa jaringan limpa untuk mengambil sisa cairan limfosit.

Suspensi limfosit disentrifugasi selama 10 menit pada 1500 rpm dan buang supernatnya. Ambil endapan, suspensikan dalam buffer lisis amonium klorida (5 ml untuk 1 limpa). Inkubasikan selama 5 menit pada temperatur kamar dengan sesekali digojog pelan. Sentrifugasi selama 10 menit pada 1500 rpm, lalu buang supernatan. Endapan disuspensikan dalam media RPMI 1640. Hitung jumlah dengan hemositometer lalu buat suspensi sel limfosit dengan konsentrasi sel limfosit yang dibutuhkan dalam media sekitar $2 \cdot 10^6$ sel/ml.

Analisis Data

Data absorbansi dari ELISA *reader* dianalisis menggunakan program *SPSS statistics 17.0*. Semua kelompok perlakuan baik ES, ET, ST, EST maupun ETS dibandingkan dengan kelompok kontrol. Analisis yang digunakan ialah *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*. Jika SD yang didapat lebih dari 0,05 maka data tersebut telah terdistribusi normal. Sebaliknya, jika $SD < 0,05$ maka data tersebut tidak terdistribusi normal. Data yang terdistribusi normal dapat langsung dianalisis dengan membandingkan rata-rata dari masing-masing kelompok menggunakan analisis *One-Way ANOVA*.

Dalam analisis *One-Way ANOVA* asumsi yang digunakan ialah asumsi LSD dan *Tukey* jika jumlah data (n) sama dalam tiap kelompok perlakuan atau *Scheffe* jika jumlah data dalam tiap kelompok perlakuan berbeda. Dapat dilihat signifikansi (*sig.*) dengan taraf kepercayaan 95% dari perbandingan rata-rata kelompok perlakuan dengan kontrol maupun kelompok perlakuan lain. Jika nilai probabilitas (P) atau signifikansi sama dengan 0,00 atau kurang dari 0,05 maka data tersebut berbeda bermakna. Begitu pula sebaliknya, jika $P > 0,05$ maka data tersebut tidak berbeda bermakna.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi herba

Hasil determinasi simplisia kering herba sambiloto dan rimpang temulawak menunjukkan bahwa bahan dari CV. Indmira adalah benar *Andrographis paniculata* dan *Curcuma xanthorrhiza*.

Hasil rendemen ekstrak kental

Rendemen ekstrak kental yang dihitung dalam persen bobot per bobot (% b/b) dengan membandingkan hasil ekstrak kental yang didapat dan jumlah serbuk yang digunakan sebelumnya.

Berat ekstrak kental etanol temulawak yang didapatkan sebesar 19,62g dengan nilai rendemen 3,92 % b/b. Sedangkan, berat ekstrak kental etanol sambiloto yang didapatkan 18,27 g dan rendemen ekstrak sambiloto sebesar 5,78 % b/b.

Analisis fitokimia ekstrak

Analisis kualitatif ekstrak etanol

Analisis kualitatif ialah untuk melihat adakah senyawa kurkumin pada ekstrak etanol temulawak dan andrografolid pada ekstrak etanol sambiloto sekaligus melihat adakah senyawa lain yang juga terkandung dalam ekstrak etanol sambiloto dan temulawak.

Ekstrak etanol temulawak (EET) pada uji KLT menggunakan fase gerak campuran antara kloroform, etanol dan asam asetat glasial dengan perbandingan berurut (94 : 2,5 : 0,5)^{v/v}. Sampel ialah EET dengan kadar 10 % b/v dengan volume penotolan 1 µl yang direplikasi 2x dalam jumlah yang sama. Pembanding yang digunakan ialah kurkumin dengan kadar 1 % b/v pada volume penotolan bertingkat 0,5 µl, 1 µl, dan 3 µl.

Hasil kromatogram sebelum penyemprotan yang didapat dari uji KLT EET 10 % b/v dapat dilihat pada gambar 1. Dari semua totolan terdapat satu bercak yang sama antara sampel dan pembanding, yaitu pada *hRf* 59 dengan fluoresensi coklat di bawah UV 366 nm dan berwarna kuning pada pengamatan di bawah sinar tampak dan UV 254 nm. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel yang digunakan mengandung senyawa pembanding yaitu kurkumin.

Banyaknya bercak yang timbul menunjukkan bahwa terdapat beberapa komponen senyawa dari sampel selain kurkumin. Jika diamati pada UV 254 nm terdapat pula bercak dengan pepadaman pada *hRf* 78. Maka dapat dikatakan, pada bercak dengan *hRf* 78 terdapat senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dalam sampel EET 10 % b/v yang mampu menurunkan energi dengan mengabsorpsi sinar UV yang dipancarkan. sehingga tampak pepadaman warna.

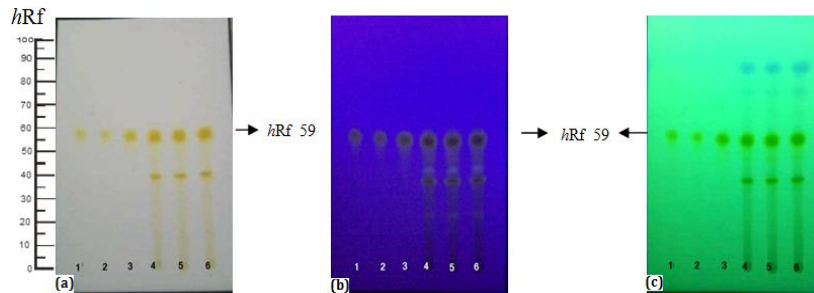
Untuk memperjelas bercak digunakan pereaksi semprot yaitu Anisaldehida Asam Sulfat (AAS). Hasil kromatogram dari plat setelah penyemprotan dapat terlihat pada gambar 2. Deteksi menggunakan AAS akan memberikan warna merah hingga ungu pada cahaya tampak jika senyawa tersebut merupakan senyawa terpenoid (Wagner & Baladt, 1984). Sampel dan replikasinya memberikan warna yang sama dengan pembanding, berwarna ungu pada *hRf* sekitar 57 sampai 59. Beberapa bercak lain juga memberikan warna pink hingga coklat tua. Perubahan warna terjadi secara cepat yang

awalnya ungu menjadi warna coklat tua dan berwarna kemerahan tampak memudar karena terjadi degradasi senyawa yang disebabkan karena panas sehingga gugus -OH dan ikatan karbon terputus. Asam sulfat ialah salah satu pereaksi warna bersifat korosif yang dipakai untuk lapisan yang benar-benar anorganik seperti silika gel yang berkaitan dengan kalsium sulfat, alumina, atau kiselgur. Pemberian reaksi semprot asam sulfat pada lapisan akan bereaksi dengan gugus organik yang telah terikat di lapisan fase diam. Maka, jika lapisan yang telah disemprot dengan asam sulfat dipanaskan sampai 100°C, maka ikatan rangkap dari senyawa-senyawa organik pada lapisan akan terputus dan terbakar melepaskan karbon yang berwarna hitam sehingga akan tampak lebih gelap hingga hitam dengan latar belakang putih (Gritter, 1985).

Warna awal dari semua bercak rata-rata merah hingga ke ungu, hal tersebut menunjukkan bahwa dalam deteksi EET 10 % b/v terdapat banyak senyawa organik atau senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi, salah satunya kurkumin dan senyawa lain dengan ikatan rangkap terkonjugasi atau turunan kurkumin yang mempunyai polaritas berbeda. Terdapat pula senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi atau senyawa yang memiliki cincin aromatik. Penjelasan hasil bercak kromatogram sampel EET 10 % b/v dan pembanding kurkumin 1 % b/v (Tabel I).

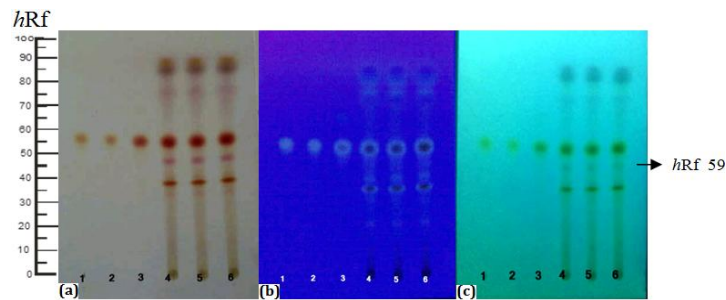
Uji KLT untuk ekstrak etanol sambiloto (EES) menggunakan fase gerak kloroform dan metanol dengan perbandingan (9:1) ^{v/v}. Penentuan fase gerak yang cenderung nonpolar berdasarkan sifat kepolaran senyawa yang ingin didapatkan yaitu andrografolid. Andrografolid murni 0,1 % b/v digunakan sebagai pembanding untuk sampel EES dengan kadar 1 % b/v. Volume pembanding yang digunakan 2 µl, 3 µl, dan 6 µl. Sementara volume penotolan sampel 3 µl dengan replikasi 2x dalam volume yang sama.

Hasil kromatogram sebelum dilakukan penyemprotan tak terlihat bercak apapun pada pengamatan di bawah cahaya tampak maupun UV 366 nm. Namun, pada pengamatan di bawah UV 254 nm terdapat pepadaman pada *hRf* sekitar 18 hingga 23 untuk pembanding baku standar dan pada sampel EES 1 % b/v dengan *hRf* 20. Dari warna bercak yang dihasilkan dan rentang *hRf* yang tak berbeda jauh dengan sampel, maka dapat dikatakan bahwa EES 1 % b/v juga mengandung senyawa andrografolid yang sama seperti pembanding. Perbedaan *hRf* pada kromatogram lebih disebabkan karena bercak hasil elusi agak melengkung bukan karena perbedaan polaritas.



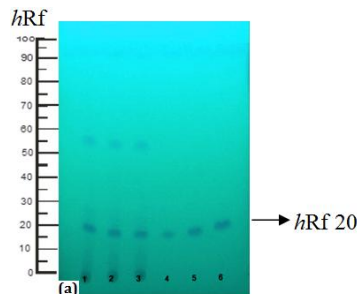
Gambar 1. Kromatogram Ekstrak Etanol Temulawak (EET) yang Diamati Di bawah (a) Sinar tampak; (b) UV 366 nm; (c) UV 254 nm

Keterangan : **Sistem KLT** (Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄; Fase gerak : Kloroform : Etanol : Asam Asetat glasial (94:2,5:0,5) v/v; Jarak elusi: 8 cm) **Totolan** : (1 : Kurkumin 1% 0,5µL; 2 : Kurkumin 1% 1µL; 3 : Kurkumin 1% 3µL; 4 : EET 10% 1µL; 5 : EET 10% 1µL; 6 : EET 10% 1µL)



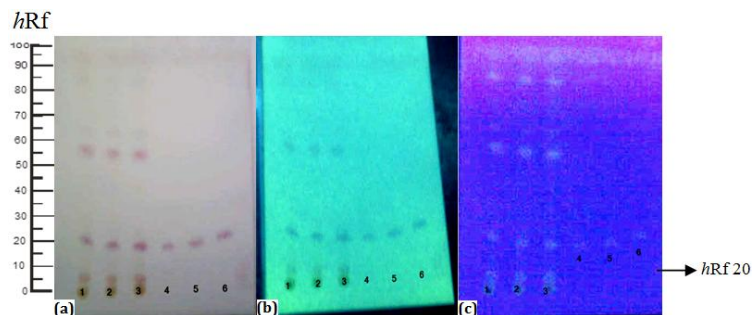
Gambar 2. Kromatogram EET Setelah Penyemprotan dengan Anisaldehida Asam Sulfat Di bawah (a) Cahaya tampak; (b) UV 366 nm; (c) UV 254 nm.

Keterangan : **Sistem KLT** (Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄; Fase gerak : Kloroform : Etanol : Asam Asetat glasial (94:2,5:0,5) v/v; Jarak elusi: 8 cm) **Totolan** : (1 : Kurkumin 1% 0,5µL; 2 : Kurkumin 1% 1µL; 3 : Kurkumin 1% 3µL)



Gambar 3. Kromatogram EES pada UV 254 nm

Keterangan : **Sistem KLT** (Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄; Fase gerak : Kloroform : Kloroform : Metanol (9:1) v/v; Jarak elusi: 8 cm) **Totolan** : (1 : EES 1% 3µL; 2 : EES 1% 3µL; 3 : EES 1% 3µL; 4 : Andrografolid 0,1% 2µL; 5 : Andrografolid 0,1% 3µL; 6 : Andrografolid 0,1% 6µL)



Gambar 4. Kromatogram Ekstrak Etanol Sambiloto (EES) Setelah Penyemprotan yang Diamati Pada (a) sinar tampak; (b) UV 254 nm; dan (c) UV 366 nm

Keterangan : **Sistem KLT** (Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄; Fase gerak : Kloroform : Kloroform : Metanol (9:1) v/v; Jarak elusi: 8 cm) **Totolan** : (1 : EES 1% 3µL; 2 : EES 1% 3µL; 3 : EES 1% 3µL; 4 : Andrografolid 0,1% 2µL; 5 : Andrografolid 0,1% 3µL; 6 : Andrografolid 0,1% 6µL)

Tabel I. Hasil Kromatogram Ekstrak Etanol Temulawak (EET)

Totolan	hRf	Warna					
		sebelum disemprot			setelah disemprot		
		Tampak	UV 254	UV 366	Tampak	UV 254	UV 366
Standar 1 0,5 μ L	59	Kuning	Kuning	Coklat	Ungu	Kuning	Putih
Standar 2 1 μ L	59	Kuning	Kuning	Coklat	Ungu	Kuning	Putih
Standar 3 3 μ L	58	Kuning	Kuning	Coklat	Ungu	Kuning	Putih
Sampel 1 EET 10%	57	Kuning	Kuning	Coklat	Ungu	Coklat	Putih-coklat
Sampel 2 EET 10%	57	Kuning	Kuning	Coklat	Ungu	Coklat	Putih-coklat
Sampel 3 EET 10%	57	Kuning	Kuning	Coklat	Ungu	Coklat	Putih-coklat

Tabel II. Hasil Kromatogram Ekstrak Etanol Sambiloto (EES)

Totolan	hRf	Warna bercak				
		Sebelum disemprot			Setelah disemprot	
		UV 254	UV 366	Tampak	UV 254	UV 366 nm
Sampel 1 1% 3 μ L	20	Pemadaman	-	Ungu	Pemadaman	Fluoresensi putih
Sampel 2 1% 3 μ L	20	Pemadaman	-	Ungu	Pemadaman	Fluoresensi putih
Sampel 3 1% 3 μ L	20	Pemadaman	-	Ungu	Pemadaman	Fluoresensi putih
Standar 1 (2 μ L)	18	Pemadaman	-	Ungu	Pemadaman	Fluoresensi putih
Standar 2 (3 μ L)	19	Pemadaman	-	Ungu	Pemadaman	Fluoresensi putih
Standar 3 (6 μ L)	23	Pemadaman	-	Ungu	Pemadaman	Fluoresensi putih

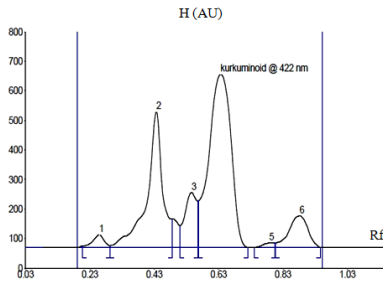
Kelengkungan bercak disebabkan karena elusi yang kurang sempurna akibat bejana yang masih belum terjenuhi merata oleh fase gerak. Bercak dengan pemadaman yang sama dengan pembanding juga terdapat pada hRf 56. Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya senyawa lain yang analog dengan andrografolid, namun berbeda polaritasnya.

Kromatogram yang telah disemprot menggunakan AAS juga memberikan hasil deteksi dengan beberapa bercak berwarna ungu pada pengamatan cahaya tampak. Sampel dengan hRf yang sama dengan hRf pembanding juga memberikan warna ungu, maka dapat dikatakan andrografolid juga merupakan senyawa terpenoid. Bercak lain yang tak tampak sebelum penyemprotan menjadi tampak pada sampel EES 1 % b/v dan replikasinya yaitu pada hRf 5, 68, dan 89 yang juga menunjukkan warna pemadaman pada UV 254 nm dan fluoresensi putih di UV 366 nm seperti warna dari pembanding namun nilai hRf berbeda. Maka dapat dikatakan terdapat banyak senyawa lain yang juga memiliki ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik dilihat dari kesamaan warna yang timbul jika dibandingkan dengan pembanding andrografolid yang merupakan senyawa diterpen lakton. Kemungkinan senyawa tersebut juga merupakan analog andrografolid dengan polaritas yang berbeda-beda karena nilai hRf yang dihasilkan berbeda. Hasil kromatogram EES 1 % b/v lebih lengkapnya dapat dilihat pada tabel II.

Analisis Kuantitatif Ekstrak Etanol

Uji kuantitatif yang dilakukan pada penelitian ini dengan melihat berapa besar kadar andrografolid pada ekstrak etanol sambiloto 1 % b/v (EES) dan kadar kurkumin pada ekstrak etanol temulawak 10 % b/v (EET). Analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur hasil kromatogram menggunakan TLC scanner atau yang kita sebut densitometer. Plat KLT yang dibaca merupakan kromatogram sebelum dilakukan penyemprotan dengan AAS. Dari pembacaan dengan alat densitometer akan didapat data berupa luas area dan profil KLT dari semua bercak yang terluhi pada proses KLT. Pembanding merupakan standar sebagai patokan untuk mengukur kadar andrografolid atau kurkumin dalam ekstrak etanol. Pengukuran kadar dilakukan dengan membuat kurva baku terlebih dahulu dari 3 standar dalam volume penotolan yang berbeda. Setelah itu, volume penotolan dari sampel dimasukkan dalam persamaan kurva baku, maka akan didapatkan nilai kadar kandungan pada masing-masing ekstrak.

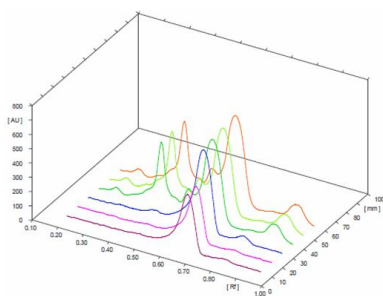
Gambar 5 merupakan gambar dua dimensi dari profil KLT dari ekstrak etanol temulawak 10 % b/v (EET). Puncak-puncak yang timbul ialah bercak yang dapat terluhi oleh fase gerak dalam suatu fase diam tertentu. Kromatogram EET dianalisis kuantitatif pada panjang gelombang 422 nm untuk mengetahui kadar kandungan kurkumin.



Gambar 5. Profil densitometri dua dimensi ekstrak etanol temulawak

Dalam penotolan pembandingan kurkumin pada proses KLT sebelumnya, dilakukan volume penotolan bertingkat yaitu volume 0,5 µl, 1 µl, dan 3 µl. Tujuannya ialah untuk menentukan kurva baku kurkumin sehingga dapat dihitung nilai kadar kurkumin dari EET. Kadar kurkumin pembandingan dapat dilihat pada Tabel IV dengan perhitungan yang terlampir pada. Persamaan kurva baku sumbu y sebagai luas area dan sumbu x merupakan kadar, yaitu $y = 611,1x + 16.514,53$.

Analisis menggunakan densitometer juga memberikan nilai luas area dari setiap bercak yang timbul pada kromatogram sampel EET. Nilai luas area ketiga sampel EET masing-masing, dimasukkan sebagai nilai y ke dalam persamaan kurva baku $y = 611,1x + 16.514,53$ sehingga didapat nilai x sebagai kadar. Hasil rata-rata kadar kurkumin dalam 1 µl sampel EET ialah 0,029 mg dengan persentase kadar kurkumin sebesar 28,79 % b/b. Pembandingan merupakan senyawa tunggal dengan satu puncak dari tiap penotolan (Gambar 6). Sementara sampel EET tiap bercak menghasilkan banyak puncak-puncak kecil yang berarti masih banyak senyawa yang larut etanol lain selain kurkumin.



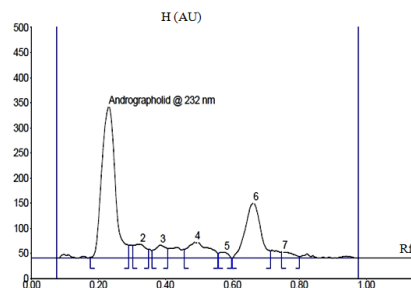
Gambar 6. Profil KLT tiga dimensi sampel eet dan standar kurkumin 1 % b/v

Keterangan:
 kurkumin —————
 sampel EET —————

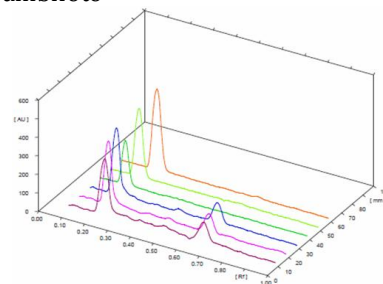
Plat KLT Ekstrak Etanol Sambiloto (EES) dan pembandingan andrografolid 0,1 % b/v sebelum penyemprotan dengan AAS dianalisis

menggunakan densitometer pada panjang gelombang 232 nm untuk mendapatkan profil kromatografi lapis tipis EES (Gambar 7) dan mengetahui nilai luas area dari masing-masing bercak yang timbul. Dapat dilihat pula gambar tiga dimensi dari profil kromatogram dari sampel EES maupun pembandingan andrografolid (Gambar 8). Adanya bercak pada Rf yang sama terlihat dari deratan puncak pada tiap totalan yang menunjukkan bahwa EES mengandung andrografolid. Perbedaan ketinggian puncak dan luas area yang dihasilkan dikarenakan adanya perbedaan volume dan konsentrasi pada penotolan bercak.

Perhitungan luas area dan kadar yang dihasilkan andrografolid sebagai pembandingan pada volume penotolan bertingkat, didapatkan persamaan kurva baku untuk andrografolid sambiloto $y = 1834,08x + 2585,63$. Luas area dari bercak sampel EES yang memiliki nilai hRf yang sama dengan andrografolid pembandingan dimasukkan nilai luas area ke dalam persamaan $y = 1834,08x + 2585,63$. Hasil perhitungan terlampir pada lampiran 11 dan didapatkan rata-rata kadar sambiloto dalam 3 µL sampel sebesar 0,00392 mg dan persentase kadar andrografolid dalam sampel EES sebesar 11,43 % b/b.



Gambar 7. Profil densitometri dua dimensi ekstrak etanol sambiloto



Gambar 8. Profil KLT Tiga Dimensi Sampel EES dan Standar Andrografolid 0,1% b/v

Keterangan:
 sampel EES —————
 andrografolid —————

Isolasi limpa dari mencit balb/c

Hewan uji yang digunakan ialah lima ekor mencit jantan galur Balb/c berumur ± 2 bulan yang didapatkan dari LPPT UGM unit II. Hewan uji menggunakan mencit galur Balb/c karena galur ini banyak digunakan untuk uji imunologi karena sensitivitasnya yang cukup tinggi dan mudah diperoleh di Indonesia. Mencit yang digunakan ialah mencit jantan karena lebih sedikit dipengaruhi hormon sehingga variasi hasil akan lebih kecil dibanding dengan mencit betina (Barata, 2009). Mencit jantan Balb/c dikorbkan lalu dilakukan pengambilan organ limpa karena jumlah sel limfosit tertinggi berada di limpa (sekitar 65 %) dibanding jaringan lain. Sel limfosit berada dalam jaringan limpa dengan jumlah limfosit sekitar 72×10^9 (Abbas *et.al*, 2012).

Preparasi bahan

Pembuatan stok ekstrak etanol sebagai sediaan uji

Pembuatan larutan stok ekstrak etanol dilakukan untuk mempermudah membuat sediaan uji dengan lima perbandingan campuran ekstrak, yaitu sabiloto 100 % (ES); temulawak 100% (ET); 50 % sabiloto dan 50 % temulawak (ST); 75 % sabiloto dan 25 % temulawak (EST); 75 % temulawak dan 25 % sabiloto (ETS). Konsentrasi ekstrak etanol yang diinginkan ialah 0,0075 % b/v dalam tiap sumuran. Penentuan konsentrasi ini mempertimbangkan kepekatan ekstrak dalam tiap sumuran. Jika terlalu pekat, ditakutkan dalam pengujian *in vitro* sel nantinya bisa mati karena toksik atau terlalu pekat. Dalam pembuatan sediaan uji, mula-mula dibuat stok A dimana 1,5 gram dari masing-masing ekstrak etanol sabiloto (EES) maupun temulawak (EET) dilarutkan terpisah dalam 2mL campuran DMSO dan RPMI 1640. Kadar DMSO yang digunakan ialah 0,75 % sesuai protokol, kadar DMSO tidak boleh melebihi 1 %.

Sediaan uji dengan 5 perbandingan berbeda dibuat dengan mengambil larutan stok EES dan EET seperti pada tabel III.

Tabel III. Konsentrasi pemberian sediaan uji dalam tiap sumuran

	Persen Kadar EES (% b/v)	Persen Kadar EET (% b/v)
Sabiloto 100% (ES)	0,00075	-
Temulawak 100% (ET)	-	0,00075
Sabiloto 75 % + Temulawak 25% (ETS)	0,05625	0,01875
Sabiloto 50 % + Temulawak 50% (ST)	0,03750	0,03750
Sabiloto 25 % + Temulawak 75% (ETS)	0,01875	0,05625

Pembuatan stok limfosit

Limpa yang diambil dari mencit jantan Balb/c dicuci dengan 10 ml RPMI 1640 dingin tanpa serum. Pencucian dilakukan dengan memindahkan dari satu cawan petri ke petri lain dalam *laminar air flow* untuk membersihkan jaringan pengikat yang menempel pada limpa. Sel limfosit pada limpa diambil dengan menyuntikkan RPMI menggunakan jarum suntik pada berbagai sisi limpa sehingga sel dapat dikeluarkan bersama medium yang sebelumnya telah disuntikkan. Perlakuan berulang dengan menyedot lalu mengeluarkan suspensi melalui *syringe* hingga didapatkan limpa yang berwarna transparan. Cara ini dilakukan untuk menyisahkan jaringan atau gumpalan sekaligus meminimalisir kerusakan sel limfosit dalam proses isolasinya. Suspensi sel limfosit dimasukkan ke dalam tabung *ependrof* steril. Semua perlakuan dilakukan di dalam *laminar air flow* untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi.

Hasil suspensi sel limfosit dipisahkan dari supernatannya dengan mensentrifugasi selama 10 menit pada 1000 rpm. Sisa endapan merupakan sel limfosit yang masih perlu dimurnikan dengan pemberian larutan hipotonis buffer ammonium klorida. Buffer amonium klorida merupakan buffer untuk melisis eritrosit atau sel darah merah yang ikut terambil saat isolasi sel limfosit. Biarkan selama 5 menit pada temperatur kamar dengan sesekali digoyang. Setelah itu sentrifugasi kembali selama 5 menit pada 1500 rpm, buang supernatan dan suspensikan kembali dalam RPMI 1640 sebagai media pertumbuhan sel limfosit. RPMI 1640 mengandung berbagai nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel diantaranya adalah asam amino, vitamin, dan garam organik. Pada media tersebut ditambahkan FBS atau *fetal bovine serum* yang merupakan *growth factor* berfungsi untuk pertumbuhan sel limfosit dan agar sel dapat bertahan lebih lama. Fungizon dan Penstrep (*Peniciline-streptomycine*) juga ditambahkan pada medium untuk mencegah kontaminasi jamur dan bakteri pada kultur sel.

Sel limfosit hasil resuspensi dengan RPMI 1640 dihitung jumlah sel menggunakan hemositometer. Perhitungan jumlah sel dapat dilihat pada dan tujuan dilakukan perhitungan awal ialah untuk memudahkan mendapatkan stok sel limfosit dengan konsentrasi 2.10^6 sel/ml dalam media yang dibutuhkan untuk pengujian terhadap ekstrak etanol. Selain itu, karena ini merupakan pengujian *in vitro*, perlu adanya penyamaan kepadatan jumlah sel limfosit dalam tiap sumuran pada masing-masing kelompok agar dapat dibandingkan respon imun yang dihasilkan terhadap proliferasi sel limfosit tersebut. Dalam

perhitungan digunakan *tryphan blue* pada sejumlah suspensi sel limfosit untuk membedakan sel-sel yang hidup dan sel yang telah mati. Zat warna tersebut memudahkan melihat sel dengan hemositometer, dimana zat warna akan terserap oleh sel yang telah mati. Sel yang telah mati akan berwarna karena dinding sel yang telah berlubang-lubang. Pengamatan di bawah mikroskop memperlihatkan sel limfosit yang tampak bulat dan bergerombol dengan inti sel yang berukuran kecil. Sel limfosit yang ada merupakan sel limfosit secara umum yang sulit dibedakan secara visual antara sel T dan sel B dimana secara morfologik kedua sel tersebut hampir sama.

Stok limfosit dalam media RPMI 1640 diinkubasi terlebih dahulu dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37° C. Tujuan inkubasi tersebut ialah sebagai bentuk adaptasi sel dan untuk menumbuhkan sel limfosit agar dapat berproliferasi dan terbentuklah kultur sel dalam jumlah banyak. Pemilihan suhu 37° C untuk menyamakan suhu tubuh agar sel tetap hidup dan tumbuh berkembang dengan adanya nutrisi dari medium komplit. FBS dalam medium komplit akan membantu pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel.

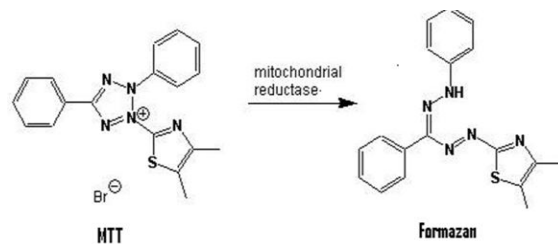
Uji Proliferasi sel dengan metode MTT reduction

Daya imunomodulator dari bahan uji yang merupakan ekstrak etanol dilakukan secara *in vitro* dengan uji MTT reduction pada 96-well multiplate (multiplate dengan 96 sumuran). Daya imunomodulator dilihat berdasarkan kemampuan sel untuk berproliferasi jika diberikan ekstrak etanol yang berperan sebagai antigen. Uji daya imunomodulator ini dilakukan secara *in vitro* sebab tidak memerlukan waktu perlakuan yang panjang dan lebih murah dibanding pengujian secara *in vivo*. Selain lebih hemat dalam penggunaan hewan uji, perlakuan untuk adaptasi limfosit dan proses secara *in vitro* akan berlangsung lebih cepat, yaitu 1 hingga 2 hari. Namun, pengujian secara *in vitro* perlu hati-hati dan ketelitian yang tinggi, mengingat sangat riskannya terjadi kontaminasi baik pada isolasi sel maupun pemberian senyawa-senyawa lain nantinya.

Stok limfosit dengan konsentrasi 2.10⁶ sel/ml dimasukkan 100 µl dalam tiap sumuran. Kemudian sel limfosit tersebut diberi perlakuan menggunakan 100 µl sediaan uji dengan pembagian 6 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol berisikan pelarut dan 5 lainnya ialah kelompok perlakuan dengan pemejanan 5 sediaan uji yang berbeda sesuai rancangan percobaan. Masing-

masing sumuran ditambahkan 2 µl PHA untuk mengetahui apakah terdapat respon imun atau tidak. PHA berperan sebagai antigen yang digunakan untuk merangsang terjadinya proliferasi limfosit T, limfosit B, dan produksi limfokin dimana lektin PHA mampu memicu aktivitas pada sel T jika terikat pada reseptor sel T manusia (Kresno 2001; Baratawidjaja & Rengganis, 2010). Kemudian sel diinkubasi sesuai rencana penelitian yaitu selama 24, 48, dan 72 jam.

Sesuai namanya, MTT reduction merupakan metode kolorimetri yang menggunakan MTT atau tetrazolium (3-(4,5-dimetiltazol-2-il)2,5-difenil tetrazolium bromida) sebagai senyawa untuk mengukur proliferasi sel. Sebanyak 10 µl MTT 0,003 % dimasukkan pada sel yang telah diinkubasi sebelumnya. Setelah pemberian MTT, sel diinkubasi kembali dalam inkubator CO₂ suhu 37° C selama 4 jam. Setelah itu, pemberian 100 µl reagen stopper larutan natrium deodesil sulfonat 10 % dalam HCL 0,01 N untuk menghentikan reaksi enzimatik. Multiplate dengan 96 sumuran tersebut didiamkan semalaman pada suhu ruang dan hasilnya diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.



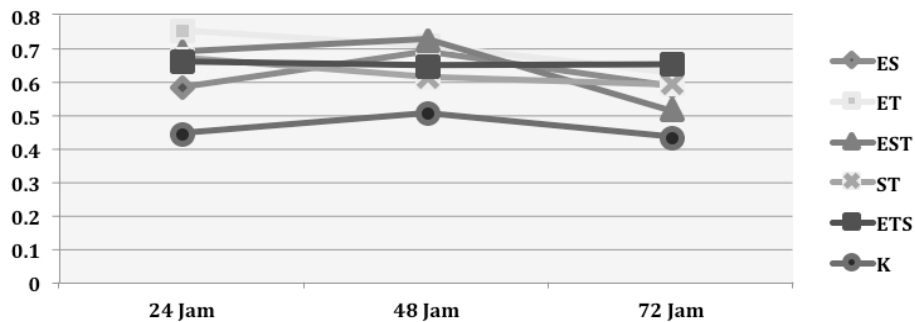
Gambar 9. Reaksi reduksi MTT (Mosmann, 1983)

Metode MTT reduction merupakan metode untuk melihat kemampuan sel hidup dalam mereduksi garam tetrazolium yang terdapat dalam senyawa MTT tersebut. MTT merupakan senyawa yang larut air dan berwarna kuning. Larutan MTT yang awalnya berwarna kuning akan membentuk kristal formazon yang berwarna ungu karena tereduksi. Garam tetrazolium dari MTT tereduksi karena adanya aktivitas enzim mitokondrial suksinat dehidrogenase yang dimiliki pada sel hidup (Gambar 9). Kristal formazon tersebut akan larut sehingga dapat dibaca secara spektrofotometri pada rentang panjang gelombang 500-600 nm. Nilai absorbansi akan terukur dari jumlah kristal formazon yang terbentuk dan berkorelasi dengan jumlah sel hidup dalam kultur (Wang et al, 2009). Proliferasi sel akan terlihat jika jumlah sel pada kondisi awal (kontrol) akan bertambah lebih besar pada kelompok perlakuan.

Tabel IV. Mean dan SD hasil OD limfosit

Kelompok Uji	Mean ± SD		
	24 Jam	48 Jam	72 Jam
ES	0,585 ± 0.03	0,692 ± 0.01	0,590 ± 0.01
ET	0,755 ± 0.04	0,709 ± 0.02	0,627 ± 0.02
EST	0,691 ± 0.01	0,726 ± 0.09	0,519 ± 0.01
ST	0,671 ± 0.08	0,616 ± 0.01	0,595 ± 0.01
ETS	0,661 ± 0.06	0,649 ± 0.01	0,653 ± 0.03
Kontrol	0,446 ± 0.01	0,506 ± 0.03	0,435 ± 0.00

Keterangan : ES = Ekstrak Sambiloto 100%; ET = Ekstrak Temulawak 100%; EST = Ekstrak Sambiloto 75% dan Temulawak 25%; ST = Ekstrak Sambiloto 50% dan Temulawak 50%; ETS = Ekstrak Sambiloto 25% dan Temulawak 75%



Gambar 10. Grafik perbandingan nilai OD pada tiga waktu berbeda

Keterangan :

ES = Ekstrak Sambiloto 100%; ET = Ekstrak Temulawak 100%; EST = Ekstrak Sambiloto 75% dan Temulawak 25%; ST = Ekstrak Sambiloto 50% dan Temulawak 50%; ETS = Ekstrak Sambiloto 25% dan Temulawak 75%

Perhitungan proliferasi sel menggunakan metode MTT *reduction* memiliki beberapa keuntungan antara lain; lebih sederhana, ekonomis, cepat, aman, dan tidak menghasilkan limbah yang berbahaya. Pengukuran proliferasi sel akan lebih susah dan membutuhkan waktu yang lebih lama jika menggunakan *direct counting*. *Direct counting* atau perhitungan langsung merupakan salah satu metode lain dalam pengukuran proliferasi sel dimana perkiraan sel hidup dan sel mati dilihat secara langsung di bawah mikroskop lalu dihitung secara manual untuk ke 96 sumuran. Perhitungan sel secara manual akan lebih susah dengan latar yang berwarna akibat penggunaan ekstrak. Oleh karena itu, metode MTT *reduction* akan lebih efisien dengan pembacaan jumlah kristal formazon yang terlarut dan diukur sebagai absorbansi dan dinyatakan dengan nilai OD atau *optical density*.

Pengukuran proliferasi sel limfosit

Sel limfosit dalam keadaan normal tidak membelah diri. Namun, adanya stimulasi dari mitogen salah satunya PHA akan memicu proliferasi pada sel T. Jika limfosit teraktivasi,

perubahan-perubahan seperti transformasi, proliferasi, diferensiasi akan lebih nampak jelas. Pemberian ekstrak etanol dalam penelitian ini bertujuan melihat perubahan sel limfosit dalam aktivasinya untuk membelah diri atau berproliferasi. Hasil semua kelompok perlakuan setelah inkubasi 24 jam, 48 jam, dan 72 jam akan diamati perbedaan yang terjadi tiap jamnya dibanding kelompok kontrol yaitu pelarut dengan PHA. Perlakuan dilakukan pada 3 jam yang berbeda, karena sel berproliferasi tidak dalam waktu yang bersamaan kecuali sel tersebut telah dilaparkan terlebih dahulu. Sangat memungkinkan beberapa sel ada yang telah berproliferasi pada jam ke 24 dan sel limfosit yang lain tidak berproliferasi, begitu pula pada jam ke 36 dan pada jam ke 72. Maka untuk mendapatkan gambaran secara lengkap, pengukuran sel dilakukan pada 3 waktu berbeda hingga pada jam ke 72 semua sel telah terukur sebagai sel yang telah mengalami proliferasi.

Nilai OD telah dianalisis menggunakan program SPSS 17.0 untuk melihat signifikansi perbedaan antar perlakuan dari semua kelompok termasuk kelompok kontrol. Perlu adanya

pengujian normalitas terlebih dahulu untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas tersebut menggunakan metode *One-Sample Kolmogorov-Smirnov*, karena jumlah data yang dianalisis kurang dari 50 data. Data terdistribusi normal jika nilai $P > 0.05$ dan sebaliknya jika nilai $P < 0.05$ maka data tak terdistribusi normal. Setelah diketahui jika data terdistribusi normal, uji ANOVA dapat dilakukan untuk pengujian parametrik dan mampu menyimpulkan perbedaan antar kelompok percobaan. Analisis yang lebih mendalam dapat dilihat dengan uji Tukey untuk jumlah N (data) yang sama dan *Schaffe* untuk kelompok dengan jumlah yang berbeda. Selain keduanya, uji LSD juga digunakan dalam menganalisis perbedaan antar kelompok karena uji itu lebih sensitif. Analisis SPSS didapatkan nilai Mean dan SD dari besar OD sel limfosit sesuai pada Tabel IV.

Secara keseluruhan terbukti bahwa semua kelompok perlakuan baik menggunakan ekstrak etanol sambiloto maupun ekstrak etanol temulawak ternyata mampu memberikan efek imunomodulator dengan proliferasi sel limfosit atau peningkatan jumlah sel limfosit. Hampir semua kelompok mengalami kenaikan jumlah sel dalam 3 kali pengamatan di waktu berbeda. Adanya perbedaan hasil tertinggi dari nilai proliferasi sel pada waktu yang berbeda dapat dikarenakan karena adanya perbedaan waktu proliferasi dari tiap selnya. Selain itu, efek dual kurkumin yang satu sisi mampu menekan dan sisi lain mampu menaikkan ternyata juga mempengaruhi uji proliferasi sel ini, meskipun belum diketahui secara jelas pada jalur dan dosis berapa kurkumin mempengaruhi sistem imun. Namun, pada semua pengamatan yang berbeda, jumlah sel dengan nilai OD tertinggi berasal dari kelompok yang menggunakan bahan uji dengan kandungan 50% lebih di dalamnya ialah ekstrak etanol temulawak yaitu setara dengan kadar lebih dari 5,63 mg/ml. Sementara berdasarkan literatur, umumnya proliferasi sel limfosit dilihat pada 2 hingga 3 hari atau pada jam ke-48 dan jam ke-72 dimana pada rentang tersebut merupakan waktu optimum sel limfosit berproliferasi setelah perlakuan dengan MTT. Jika berdasarkan literatur tersebut, kelompok perlakuan kombinasilah yang memberikan efek imunomodulator lebih baik dibandingkan kelompok tunggal (ET maupun ES). Gambar 10 memperlihatkan grafik dari seluruh kelompok perlakuan termasuk kontrol pada 3 waktu berbeda.

Pengamatan antar jam memperlihatkan hasil OD jam ke-24 yaitu kelompok ET yang ternyata menunjukkan nilai tertinggi dari nilai OD pada pengamatan jam lain. Hal tersebut dapat

menunjukkan adanya reaksi proliferasi langsung dari sel limfosit yang menjadi aktif akibat pemberian mitogen PHA. Pengamatan jam berikutnya terjadi penurunan dari nilai OD namun tetap berbeda signifikan dari kontrol. Penurunan tersebut mungkin saja terjadi karena beberapa sel yang telah membelah pada jam ke-0 kembali di tahap G_0 dalam siklus sel atau kondisi istirahat. Sel baru akan memasuki tahap G_1 kembali dan mulai membelah setelah adanya antigen. Perhitungan proliferasi sel akan lebih mudah jika sel dipuaskan dan berada pada tahap yang sama dari siklus sel yaitu di tahap S. Dengan mengurangi nutrisi tersebut, sel akan berada di fase stasioner dan akan jelas diketahui bahwa hampir semua sel membelah di waktu bersamaan yang umumnya pada jam ke-24 hingga 72 jam dari tahap awal. Perlakuan kombinasi ekstrak lebih baik dibandingkan kelompok dengan ekstrak tunggal baru nampak setelah pengamatan jam ke-48. Pada pengamatan jam ke-72 juga menunjukkan kelompok kombinasi ekstrak etanol temulawak dengan ekstrak etanol sambiloto (ETS) ternyata lebih baik dari kelompok perlakuan dengan sambiloto 100 % (ES) maupun temulawak 100 % (ET). Terlihat Kelompok ETS atau yang setara dengan 0,56 mg/ml ekstrak etanol temulawak dan 0,18 mg/ml ekstrak etanol sambiloto lebih mampu meningkatkan proliferasi sel limfosit dibandingkan kelompok 0,75 mg/ml ekstrak etanol temulawak tunggal (ET) maupun 0,75 mg/ml ekstrak etanol sambiloto tunggal (ES). Berdasarkan pada gambar 10 tersebut ETS juga memperlihatkan grafik OD yang hampir stabil antara waktu satu dengan waktu lain dibandingkan kelompok perlakuan lain.

KESIMPULAN

Kombinasi ekstrak etanol sambiloto dengan ekstrak etanol temulawak mampu meningkatkan sistem imun dengan memicu proliferasi sel namun tidak lebih baik dibandingkan dosis tunggal dari ekstrak etanol temulawak.

Efek Imunomodulator tertinggi dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit ditunjukkan dari pemberian 0,75 mg/ml ekstrak etanol temulawak (ET) yang ternyata lebih baik dari ETS yaitu pemberian kombinasi 0,56 mg ekstrak etanol temulawak dan 0,18 mg ekstrak etanol sambiloto dalam 1 mL pelarut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset Teknologi dan

Pendidikan Tinggi, dalam Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) UGM, yang telah memberikan dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Litchman, A. H., & Pillai, S. (2012). *Cellular and Molecular Immunology*, 7th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Badan POM RI. (2011). *Formularium Ramuan Obat Tradisional Indonesia Ramuan Etnomedisin vol. I*. Jakarta: CV GLOBAL EXPRESS media.
- Barata, Ketut. (2009). *Mencit Balb/C Dapat Digunakan Sebagai Hewan Model Penelitian Virus Penyakit Jembrana*. Bali: Buletin Veteriner Udayana.
- Baratawidjaja, K. G. (2000). *Imunologi Dasar*, Edisi Keempat Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bermawie, N., Rahardjo, M., Wahyuno, D., & Ma'mun. (2006). *Status Teknologi Budidaya dan Pascapanen Tanaman Kunyit dan Temulawak Sebagai Penghasil Kurkumin*. Balitro. 2(4). 84-99.
- Chao, W. W., & Lin, B. F. (2010). Isolation and Identification of Bioactive Compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Journal Chinese Medicine*.
- Delves, P. J., and Roitt, I.M. (2000). The Immune System; First of Two Parts, 37, 42. *The New England Journal of Medicine* , Volume 343 Numb 1.
- Mosmann, Tim. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Celluler Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immonological Methods* 65.
- Gritter, R. J., Bobbit, J. M., & Schwarting, A.E., (1985). *Pengantar Kromatografi* Edisi Kedua. diterjemahkan oleh Padmawinata, K. 1991. Bandung: Penerbit ITB.
- Kurniawan, A. (2011). *Aktivitas Antioksidan dan Potensi Hayati dari Kombinasi Ekstrak Empat Jenis Tanaman Obat Indonesia*. Bogor: Bogor Agricultural University Press.
- Kresno, S. B. (2001). *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi IV*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Umum Universitas Indonesia.
- Spelman, K., J. J. Burns, D. Nihols, N. Winters, S. Otterberg, & M. Tenborg. (2006). Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulator. *Alternative medicine review*. 2006 Juni : II (2). pp. 128-150.
- Trubus. (2010). *Herbal Indonesia Berkhasiat Bukti ilmiah & Cara Racik Vol. 08*. Bogor: Trubus Info kit.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1984). *Plant Drug Analysis; A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin : Springer-Verlag, 1984. hal. 299.
- Wang, K., Saito,S., Bisikirska, B., Alvarez,M., Lim, M., Rajbhandari, P.,Shen, Q., Nemenman, Basso,K., Margolin,A., Klein,U., Dalla-Favera, R., & Califano. (2009). Genome-wide identification of post-translational modulators of transcription factor activity in human B cells. *Nature Biotech.* 27:829.
- Widianto, M. B. (1987). *Immunomodulator*. Bandung: Institut Teknologi Bandung Press.