

JUSTICIA
TOXICITY TESTING

SKRIPSI

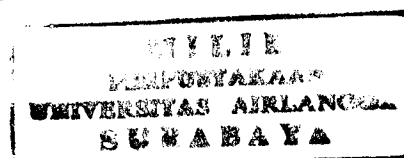
SILFIANA NIHAYAH

UJI TOKSISITAS FASA AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN *Justicia gendarussa* Burn.f. TERHADAP SEL LIMFOSIT NORMAL MANUSIA SECARA *IN VITRO*

FF 40/06
Alin
7



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2005



Lembar Pengesahan

**UJI TOKSISITAS FASA AIR DARI EKSTRAK ETANOL
DAUN *Justicia gendarussa* Burn.f. TERHADAP SEL LIMFOSIT
NORMAL MANUSIA SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

2005

Oleh :

SILFIANA NIHAYAH
NIM. 050112467

Skripsi ini telah disetujui
oleh :

Pembimbing Utama



Drs. Sukardiman M.S., Apt.
NIP. 131801629

Pembimbing Serta



Drs. Abdul Rahman M.Si., Apt.
NIP. 131653432

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Segala puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, atas nikmat, hidayah dan rahmatNya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Dengan terselesaikannya skripsi yang berjudul “UJI TOKSISITAS FASA AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN *Justicia gendarussa* Burm.f TERHADAP SEL LIMFOSIT NORMAL MANUSIA SECARA *IN VITRO*” ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Drs. Sukardiman MS., Apt sebagai pembimbing utama yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran, membimbing dan memberi dorongan kepada saya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan, dan juga sekaligus sebagai dosen wali yang telah banyak membantu dan memberi saran selama empat tahun ini.
2. Bapak Drs. Abdul Rahman MSi yang telah dengan sabar membimbing, memberi dorongan dan mengarahkan saya dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Dra. Wiwied Ekasari MS dan Drs. Herra Studiawan MSi selaku dosen penguji yang memberi banyak masukan dan kritikan demi kesempurnaan skripsi ini.
4. Bapak Drs. Bambang Prajogo E.W., MS selaku pemimpin proyek gandarusa, yang telah memberi kesempatan untuk ikut bergabung.
5. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. Noor Cholies Z. atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan sarjana.
6. Para dosen serta guru saya yang telah mendidik dan mengajarkan ilmu pengetahuan hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan sarjana.
7. Kepala Laboratorium Fitokimia beserta seluruh laboran yang telah membantu kelancaran penelitian.
8. Semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini
9. Orangtuaku yang kucintai, saudaraku yang tersayang, dan keponakanku yang lucu-lucu terimakasih atas doa, dukungan dan semangatnya yang telah diberikan tanpa henti-hentinya.

10. Teman-teman satu proyek yang juga turut membantu baik doa maupun semangat
11. Teman-teman di farmasi terutama arek-arek angkatan 2001, yang memberikan hari-hari penuh semangat dan keceriaan.
12. Arek-arek kos yang selalu setia dengerin curhat-curhat dan memberikan banyak perhatian.

Semoga Allah SWT berkenan melimpahkan karunia-Nya sebagai balasan atas kebaikan dan bantuan yang telah diberikan. Dan dengan segala kekurangan dalam penyusunan skripsi ini penyusun mohon maaf dan berharap semoga skripsi ini berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Surabaya, Agustus 2005

Penyusun

RINGKASAN

UJI TOKSISITAS FASA AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN *Justicia gendarussa* Burm.f TERHADAP SEL LIMFOSIT NORMAL MANUSIA SECARA *IN VITRO*

Silfiana Nihayah

Berdasarkan penelitian sebelumnya, *Justicia gendarussa* Burm.f mempunyai aktivitas antifertilitas, sehingga akan dikembangkan sebagai fitofarmaka. Untuk itu harus melalui serangkaian uji dari uji praklinik sampai klinik. Salah satu dari uji praklinik adalah uji toksisitas. Uji ini harus dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan penggunaan dari tanaman tersebut.

Pada penelitian ini dilakukan percobaan toksisitas terhadap kultur sel limfosit normal manusia dengan metode pewarnaan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

Bahan uji adalah fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f dengan konsentrasi 126 ppm, 252 ppm, 504 ppm, dan 1008 ppm. Sel limfosit yang digunakan diisolasi dari darah perifer dengan menggunakan campuran *Ficoll* dan *histopaque*. Suspensi sel limfosit dibuat 2×10^5 sel/mL, dimasukkan pada tiap sumur. Kemudian dimasukkan larutan uji dengan konsentrasi yang telah ditentukan pada tiap sumur dengan replikasi sebanyak tiga kali, lalu diinkubasi selama 24 jam. Pada waktu empat jam sebelum masa inkubasi berakhir, ditambahkan MTT pada tiap sumur, diinkubasi lagi selama empat jam, lalu ditambahkan reagen *stopper* yaitu SDS (Sodium Dodesil Sulfat) dan dibiarkan selama semalam. Kemudian dilakukan pengukuran kerapatan optiknya menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Sel yang hidup ditentukan berdasarkan dari kerapatan optik tersebut.

Dari data yang diperoleh kemudian diolah dengan analisis varian satu arah. Dari perhitungan diperoleh harga p lebih kecil dari 0,05, yaitu 0,001 berarti ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel limfosit normal manusia antar kelompok uji. Untuk mengetahui kelompok larutan uji yang berbeda dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*).

Selanjutnya untuk mengetahui besarnya potensi toksisitas dari larutan uji ditentukan harga LC_{50} dengan analisis probit, dan selanjutnya dibandingkan dengan standar yang ditentukan OSHA (Occupational Safety and Health Administration) untuk mengetahui tingkat toksisitasnya, dimana $LC_{50} > 20$ ppm (inhalasi) bersifat nontoksik. Harga LC_{50} yang diperoleh sebesar 3215,7242 ppm, sehingga dapat disimpulkan bahwa fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f tidak memiliki aktivitas toksik terhadap sel limfosit normal manusia secara *in vitro*.

ABSTRACT

The *in vitro* toxicity test of water phase from ethanol extract of *Justicia gendarussa* Burm.f leaves to human normal lymphocyte cell

According to previous research on antifertility activity of *Justicia gendarussa* Burm.f, it was found to be potentially developed as herbal medicine. Hence, it must be followed by premedical research then continued to clinical trials. One of the premedical research is toxicity test. Its need to be done to know the safety level usage.

This research was intended to find toxicity effect of water phase from ethanol extract of *Justicia gendarussa* Burm.f leaves on lymphocyte cells culture by addition of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). The concentration of test samples are 126 ppm, 252 ppm, 504 ppm, and 1008 ppm.

2×10^5 cells/mL suspension of lymphocyte cells were added in 96 tissue culture clusters. The water phase of *Justicia gendarussa* Burm.f leaves were added to the wells with that concentration in triplicate, then incubated for 24 hours. Following the addition of MTT, the cell was incubated further for four hours, and then the reaction was stopped by addition of SDS, and measured the optical density (OD) at wave length 550 nm using ELISA reader. The dead cells were then determined based on the OD. The result showed that water phase from ethanol extract of *Justicia gendarussa* Burm.f leaves have LC_{50} value 3215,7242 ppm.

Keywords : toxicity, *Justicia gendarussa* Burm.f, lymphocyte cell

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Lembar Pengesahan.....	ii
Kata pengantar.....	iii
Ringkasan.....	v
Abstrak.....	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	ix
Daftar Gambar.....	x
Daftar Lampiran	xi
Daftar Singkatan.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Tentang <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.....	5
2.2 Tinjauan Tentang Sel Limfosit	7
2.3 Tinjauan Tentang Kultur Sel.....	11
2.4 Tinjauan Tentang Uji Toksisitas	12
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	16
BAB IV METODE PENELITIAN.....	18
4.1 Bahan Penelitian.....	18
4.2 Alat Penelitian.....	18
4.3 Cara Kerja.....	20
4.4 Analisis Data.....	24
BAB V HASIL PENELITIAN.....	26
BAB VI PEMBAHASAN.....	31

BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	35
7.1 Kesimpulan.....	35
7.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA	36
Lampiran 1	39
Lampiran 2	40
Lampiran 3	42
Lampiran 4	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
V.1 Berat hasil ekstraksi daun gandarusa.	27
V.2 Perhitungan jumlah sel limfosit secara mikroskopis dengan menggunakan pewarnaan tripan biru.	27
V.3 Data pengukuran kerapatan optik MTT hasil pewarnaan sel limfosit karena pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa terhadap sel limfosit dengan alat ELISA <i>reader</i> pada panjang gelombang 550 nm.	28
V.4 Persentase sel mati dari sel limfosit karena pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa.	28
V.5 Tabel anava persentase sel mati dari sel limfosit karena pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa.	29
V.6 Hasil analisis uji LSD fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa .	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Gendarusin A	6
2.2 Struktur Gendarusin B	7
3.1 Skema kerangka konseptual	17
4.1 Skema rancangan penelitian	20
5.1 Tanaman <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f	26
5.2 Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji vs rata-rata persentase sel limfosit mati setelah perlakuan.....	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1 Kandungan Media RPMI 1640	38
2 Hasil analisis anava fasa air dari ekstrak etanol daun <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.....	39
3 Analisis Probit Fasa Air dari Ekstrak Etanol Daun <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.....	41
4 Foto Sel Limfosit Normal Manusia Dengan Perbesaran $1,5.10^4$ X.....	43

DAFTAR SINGKATAN

- DDT : Dichlorodiphenyltrichloroethane
GPT : Glutamate Pyruvate Transaminase
MTT : 3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5,-diphenyl tetrazolium bromide
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCB : Polychlorinated biphenyls
SGPT : Serum Glutamate pyruvate Transaminase
SGOT : Serum Glutamate Oxaloacetate Transaminase
TCDD : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin

BAB I

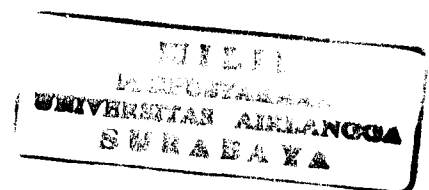
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan tumbuh-tumbuhan untuk obat di Indonesia telah berlangsung lama dan penggunaannya secara kebetulan atau atas dasar pengalaman yang sifatnya turun temurun. Obat tradisional berupa bahan-bahan alam dapat berupa bahan tunggal dan sebagian besar berupa ramuan atau racikan yang terdiri dari bahan-bahan berasal dari tumbuhan. Tidak ada pendidikan khusus tentang pembuatan ramuan obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan ini karena hanya digunakan berdasarkan pengalaman empirik dan pengetahuannya secara tradisional yang belum didukung oleh bukti-bukti ilmiah seperti kegunaan, dosis dan efek samping yang menyatakan bahwa bahan tersebut benar-benar efektif, aman dan berkhasiat (Anonim, 1996).

Dalam rangka upaya pembangunan di bidang kesehatan, obat tradisional perlu dikembangkan dan secara berangsur-angsur dimanfaatkan berdasarkan atas landasan ilmiah, sehingga dapat digunakan dalam upaya pelayanan kesehatan formal kepada masyarakat (Anonim, 1996).

Diantara sekian banyak tanaman obat yang tersebar di Indonesia, tanaman yang ingin diteliti adalah *Justicia gendarussa* Burm.f. Tanaman ini oleh masyarakat digunakan sebagai obat tradisional antara lain untuk mengobati encok (reumatik), untuk pegal-pegal dan sakit pinggang, mengeluarkan keringat dan mencegah demam serta sebagai obat cupak dan pencahar (Heyne, 1987). Disamping itu diketahui bahwa tanaman tersebut digunakan sebagai ramuan yang diminum dua kali dalam satu bulan oleh para pria di daerah Papua untuk menjarangkan kehamilan (Moeso dan Agus, 1985). Dari tanaman gandarusa tersebut terutama yang akan dikembangkan adalah kegunaannya sebagai kontrasepsi pria, karena pada umumnya metode-metode kontrasepsi kebanyakan ditujukan kepada wanita, sedangkan keikutsertaan pria sebagai pengguna kontrasepsi masih jarang. Hal ini mungkin disebabkan cara kontrasepsi untuk pria masih terbatas pada vasektomi dan kondom saja, padahal vasektomi merupakan cara kontrasepsi yang kurang ideal sebab tidak dapat dilaksanakan secara



obat tradisional pada hewan coba atau pada organ-organ tertentu, efek samping dan toksisitas.

Pada penelitian pendahuluan telah dilakukan uji toksisitas akut dan uji teratogenik yang dilakukan pada mencit secara per oral, dengan hasil bahwa fraksi etanol 60% dan fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f disimpulkan aman (Supriatin, 2003). Namun dalam kurun waktu pemakaian 52 hari dapat menyebabkan peningkatan kadar SGPT dan SGOT sehingga mempengaruhi fungsi faal hati. Di samping itu juga terjadi perubahan seluler yang nyata pada organ hati berupa kongesti pembuluh darah dan degenerasi sel hati (Prajogo, 1999). Fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa 100 ppm dan 1000 ppm menunjukkan efek toksisitas hepar pada sistem suspensi hepatosit tikus terisolasi dengan parameter enzim GPT (Wardani, 2003).

Agar fitofarmaka dapat dipertanggungjawabkan keamanannya dalam pemakaiannya pada manusia, maka akan dilakukan uji toksisitas lanjutan. Dari berbagai macam pengujian toksisitas, salah satunya adalah uji toksisitas spesifik, diantaranya yaitu toksisitas pada darah (Anonim, 1996).

Sel limfosit merupakan salah satu bagian dari sistem imunitas tubuh yaitu berperan penting pada imunitas perolehan yang menyediakan imunitas sepanjang hidup karena adanya sistem memori yang dapat merespon adanya penyakit tertentu (Baratawidjaja, 2000). Apabila ada gangguan pada sel ini maka sistem pertahanan tubuh menjadi kurang efektif. Keuntungan penggunaan sel ini adalah termasuk jenis sel dari jaringan yang tahan disagregasi, hidup, penanganannya mudah dan proliferasinya cepat. Diambil langsung dari jaringan tubuh dengan maksud teraplikasi langsung terhadap sel yang mendekati atau sesuai fisiologis tubuh dan belum mengalami modifikasi dan atau transformasi genetik (Lestari, 2002).

Uji toksisitas dipilih secara *in vitro* karena memiliki banyak keuntungan diantaranya lingkungan terkontrol, karakterisasi dan homogenitas sampel lebih baik, lebih murah karena menggunakan reagen yang lebih sedikit dan secara moral dan etik lebih baik dibandingkan dengan eksperimen menggunakan hewan coba (Freshney, 1987).

Uji toksisitas dilakukan terhadap sel limfosit yang diisolasi dari darah orang dewasa. Hal ini dikarenakan untuk menafsirkan keamanan obat bagi manusia dapat dilakukan melalui serangkaian percobaan toksisitas pada hewan. Akan tetapi, suatu percobaan farmakologi maupun toksikologi hanya dapat berarti bila dilakukan pada manusia sendiri (Darmansjah, 1995).

Pada penelitian ini digunakan fasa air dari ekstrak etanol daun tanaman gendarusa, karena pelarut tersebut tidak toksik bagi manusia. Pada fasa air tersebut terdapat glikosida flavonoid dalam jumlah yang lebih banyak daripada fraksi etanol 60% (Prajogo,2002).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f toksik terhadap sel limfosit normal manusia.

1.3 Tujuan Penelitian

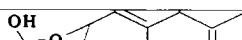
Melakukan uji toksisitas fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f terhadap sel limfosit normal manusia menggunakan metode pewarnaan MTT dengan menentukan harga LC_{50} .

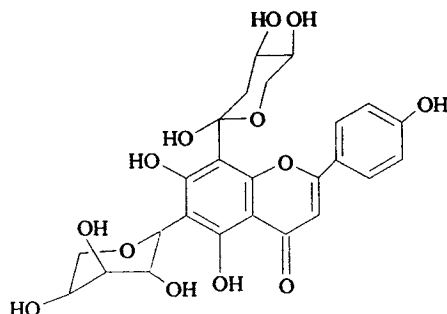
1.4 Hipotesis

Dari uraian latar belakang dan rumusan masalah, dapat disusun hipotesis bahwa fasa air daun *Justicia gendarussa* Burm.f tidak toksik terhadap sel limfosit normal manusia.

1.5 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan diperoleh data tentang uji toksisitas pada sel limfosit normal manusia sehingga dapat dimanfaatkan untuk salah satu persyaratan dalam pembuatan fitofarmaka dengan bahan aktif yang terkandung dalam daun *Justicia gendarussa* Burm.f.





Gambar 2.2 Struktur Gendarusin B (6- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-8- β -D-silopiranosilflavon atau 6-arabinosil-8-silosilapigenin)

2.1.6 Kegunaan tanaman

Daun gandarusa digunakan dalam beberapa ramuan obat tradisional. Pada umumnya sebagai obat penawar rasa nyeri. Daun-daun ditumbuk bersama cuka dan merica, digunakan untuk mengobati sakit kepala dan dengan kapur sirih serta merica untuk mengobati encok (reumatik). Daun digiling bersama adas dan pulosari dan kapur digunakan sebagai obat gosok untuk pegal-pegal dan sakit pinggang. Air rebusan daun dapat mengeluarkan keringat dan menurunkan demam. Dapat pula digunakan sebagai obat cupak atau upas putih dan sebagai pencahar (Heyne, 1987).

Di Papua, air rebusan akar dan daun gandarusa diminum oleh para suami dua kali dalam satu bulan sebagai obat kontrasepsi pria (Moeso dan Agus, 1985).

2.2 Tinjauan Tentang Sel Limfosit

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 yaitu yang disebut sistem imun yang melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen tersebut. Ada dua jenis respon imun yaitu respon imun nonspesifik (*natural / innate*) dan respon imun spesifik (*adaptive / acquired*) yang keduanya tergantung pada aktivitas sel darah putih atau leukosit. Imunitas bawaan sebagian besar melibatkan makrofag, monosit, neutrofil dan

eosinofil. Pada imunitas perolehan, yang memegang peran penting adalah limfosit, yang menyediakan imunitas sepanjang hidup karena adanya sistem memori yang dapat merespon adanya penyakit tertentu. Sistem imunitas bawaan dan perolehan secara bersama-sama akan menyediakan sistem pertahanan yang efektif (Baratawidjaja, 2000 dan Kresna, 1996)

Limfosit manusia bisa diisolasi dengan mudah dari darah perifer dengan menggunakan campuran *percoll* dan *histopaque*. *Percoll* adalah suatu polimer sukrosa yang berfungsi sebagai matriks penggandeng agar terbentuk suatu "permukaan tarik-menarik" antara satu sel dengan sel lain yang sejenis, sedangkan fungsi *histopaque* mengikat sel-sel tersebut (Lestari, 2002). Hasil isolasi dinamakan sel mononuklear, yang didalamnya terdapat limfosit dan monosit.

Limfosit T dan limfosit B berasal dari *bone marrow* dimana limfosit B akan menjadi dewasa disana sedangkan limfosit T akan bermigrasi ke sel thymus untuk menjadi limfosit T dewasa. *Bone marrow* dan sel thymus merupakan organ limfoid sentral. Pada individu dewasa, perkembangan dari limfosit T baru di sel thymus menurun dan jumlah limfosit T dipertahankan dari limfosit T dewasa yang berasal dari luar organ limfoid sentral. Lain halnya dengan limfosit B yang secara berkelanjutan diproduksi di *bone marrow* bahkan pada individu dewasa.

Setelah limfosit T dan B menjadi dewasa, maka keduanya akan memasuki sirkulasi darah dan bermigrasi ke organ limfoid perifer. Jaringan limfoid perifer tidak hanya berfungsi untuk menjebak sel fagosit yang telah memakan antigen, tetapi juga untuk menghubungkan interaksinya dengan limfosit yang akan dibutuhkan untuk membuat respon imunitas perolehan. Pada saat ada infeksi, limfosit yang mengenali agen infeksi akan berada dalam jaringan limfoid tempat mereka berproliferasi dan berdiferensiasi kemudian akan bergerak ke sel efektor untuk melawan infeksi tersebut.

Bakteri patogen dikenali antibodi hanya apabila mereka berada dalam darah dan ekstraseluler. Tetapi beberapa bakteri patogen dan parasit serta semua virus bereplikasi di dalam sel sehingga mereka tidak bisa dideteksi oleh antibodi. Oleh karena itu diperlukan adanya limfosit T yang akan menghancurkan benda asing didalam sel karena limfosit T tersebut bertanggung jawab terhadap *cell-mediated immune responses* dari imunitas perolehan. Limfosit T akan menghancurkan

bakteri patogen intraseluler dengan membunuh sel yang terinfeksi dan mengaktifkan makrofag. Selain itu limfosit T juga punya peran penting dalam penghancuran bakteri patogen ekstraseluler yaitu dengan mengaktifkan limfosit B.

Pertahanan dari limfosit yang baru terbentuk ditentukan oleh interaksinya dengan sel lain yang membentuk organ limfoid. Jika limfosit tidak mengenali antigen spesifik dan telah menjadi aktif pada jaringan limfoid perifer, maka limfosit akan meninggalkan jaringan dan bersirkulasi melewati limfa dan darah, secara berkelanjutan memasuki organ limfoid sampai suatu saat ada antigen spesifik yang dikenali atau sampai limfosit tersebut mati. Limfosit yang mati tersebut kemudian akan digantikan oleh limfosit yang baru terbentuk, sehingga jumlah limfosit dalam tubuh akan tetap konstan.

Banyak limfosit dan prosentase dari limfosit T dan limfosit B tetap konstan dikarenakan maturasi dan pertahanan limfosit yang diatur oleh sinyal yang diterima oleh reseptor antigen limfosit itu sendiri. Sinyal kuat yang diterima limfosit muda melalui reseptor antigen akan menyebabkan limfosit mati, tetapi tidak adanya sinyal yang diterima dari reseptor antigen juga akan menyebabkan kematian sel limfosit. Maka untuk bertahan hidup, limfosit harus menerima sinyal tertentu yang berkesinambungan dari lingkungan melalui reseptor antigen. Sinyal pertahanan ini didapatkan melalui sel lain di organ limfoid.

Limfosit yang gagal menerima sinyal pertahanan akan mengalami suatu bentuk "bunuh diri" yang disebut apoptosis atau kematian sel yang terprogram yang bisa diartikan sebagai pengaturan jumlah sel dalam tubuh. Produksi dari neutrofil, monosit, eritrosit, dan limfosit baru oleh *bone marrow* harus seimbang dengan hilangnya sel tersebut. Pada limfosit terjadi kekhususan karena hilangnya limfosit disebabkan karena hilangnya spesifisitas dari reseptor, dimana setiap sel dewasa baru yang bertahan hidup akan menghasilkan spesifisitas yang berbeda. Sinyal pertahanan yang diterima melalui reseptor antigen akan mengatur proses ini dengan menghambat proses apoptosis dari limfosit dan juga menjaga perkembangan dari limfosit (Janeway, 2001).

Limfosit yang merupakan 20% dari semua leukosit dalam sirkulasi darah orang dewasa yang terdiri atas sel T dan sel B, merupakan kunci pengontrol sistem imun. Sel-sel tersebut dapat mengenal benda asing dan membedakannya

dari sel jaringan sendiri. Kemampuan mengenal limfosit tersebut disebabkan oleh adanya reseptor pada permukaan sel (TCR). Sel B mengenal antigen melalui TCR yang berupa imunoglobulin (antibodi) pada permukaan selnya. Fungsi sel T umumnya adalah membantu sel B dalam produksi antibodi, mengenal dan menghancurkan sel yang terinfeksi virus, mengaktifkan makrofag dalam fagositosis dan mengontrol ambang dan kualitas sistem imun, sedangkan sel B fungsi utamanya ialah memproduksi antibodi (Baratawidjaja, 2000).

Berbagai zat dikenal mempengaruhi sistem imun. Kebanyakan zat tersebut immunosupresan, meskipun nikel dan beberapa zat lainnya terutama bersifat immunostimulan. Diantara zat-zat yang bersifat immunosupresan, diantaranya yaitu :

1. Antineoplastik : siklofosamid, nitrogen mustard, 6-merkaptopurin, azatioprin, metotreksat, 5-fluorourasil, aktinomisin, doksorubisin
2. Logam berat dan organometal : timbal, kadmium, kromium, metil merkuri, di-N-oktiltin diklorida, di-N-butiltin diklorida, kromium, natrium arsenit dan arsenat, dan arsen trioksida
3. Pestisida : DDT, dieldrin, karbaril, karbofuran, metilparation, maneb, klordan, heksaklorobenzen (HCB)
4. Hidrokarbon berhalogen : PCB, bifenil polibromin (PBB), TCDD, trikloroetilen, kloroform, pentaklorofenol
5. Macam-macam senyawa : Benzo[a]piren, metilkolantren, dietilstilbestrol, benzen, glukokortikoid.

Selain dari zat-zat tersebut, ada beberapa tanaman yang toksik terhadap sistem imun, diantaranya yaitu : *Hemidesmus indicus* (L.) Schult (anonim^a, 2005), *Tripterygium wilfordii* (Zhang, 2004), *Thea sinensis* L (anonim^d, 2005) dan *Allium sativum* L (Lestari, 2002).

Efek toksikan pada sistem imun adalah kompleks, beberapa toksikan dapat menekan kekebalan yang diperantarai sel, lainnya menekan kekebalan humoral, dan lainnya lagi dapat merangsang fungsi imun tertentu (Lu, 1995).

Akibat dari gangguan pada sel imun menyebabkan tubuh rentan terhadap berbagai infeksi baik bakteri, jamur maupun virus. Selain itu menyebabkan ruam

kulit, diare, pertumbuhan yang terganggu, hati dan limpa yang membesar (Baratawidjaja, 2000).

2.3 Tinjauan Tentang Kultur Sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup. Jaringan yang akan digunakan dipecah-pecah melalui proses enzimatik, kimiawi, ataupun secara mekanis untuk menghasilkan suspensi sel, yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai. Kultur sel yang semacam ini disebut sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer disebut *cell line* (Freshney, 1987).

Keuntungan dari penggunaan sistem kultur sel ini antara lain adalah segi kontrol lingkungan fisiko kimia yang lebih tepat serta kondisi biologis yang relatif konstan. Selain itu karakteristik dan homogenitas sampel dari sistem kultur sel lebih baik dibandingkan dengan jaringan hidup dari sel hewan dan secara ekonomi penggunaan sistem kultur ini lebih menguntungkan karena pereaksi yang digunakan lebih sedikit, konsentrasi larutan uji lebih kecil dan bahan uji yang digunakan lebih sedikit sehingga dapat menghemat bahan (Freshney, 1987).

Prinsip dasar pembiakan kultur sel secara *in vitro* yaitu dengan cara memindahkan atau mengambil sel yang akan diteliti pada jaringan asal. Kemudian sel ditempatkan dalam wadah kultur yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur. Kondisi lingkungan kultur yaitu suhu 37°C, lingkungan gas (5% CO₂ / 95% O₂) dan pH 7,4-7,7. Media yang digunakan mengandung asam amino, vitamin, garam-garam, glukosa, hormon dan faktor pertumbuhan. Keadaan garam dalam media adalah isotonik untuk menjaga ketidakseimbangan osmotik. Bikarbonat sering ditambahkan sebagai sistem dapar bersama lingkungan CO₂ sehingga kultur dapat dipelihara pada pH optimal untuk pertumbuhan. Phenol red biasa ditambahkan dalam media sebagai indikator pH yang disebabkan kontaminasi bakteri. Vitamin dan hormon terdapat dalam jumlah relatif rendah yang digunakan sebagai faktor dalam mendukung pertumbuhan sel. Pada kebanyakan kultur, penambahan serum kedalam media digunakan untuk pertumbuhan. Masalah dalam menumbuhkan kultur sel adalah adanya kontaminasi mikroorganisme. Antibiotik dan antimitotik biasanya ditambahkan

kedalam media kultur untuk menahan kontaminasi pada kultur oleh mikroorganisme. Untuk mengurangi kontaminasi preparasi dilakukan secara aseptik.

Kultur sel primer maupun *cell line* mamalia telah banyak dikembangkan untuk keperluan berbagai penelitian secara *in vitro*, termasuk memberikan informasi tentang toksisitas dari bahan kimia dan obat-obatan (Freshney, 1987).

2.4 Tinjauan Tentang Uji Toksisitas

Agar fitofarmaka dapat dipertanggungjawabkan keamanan dan khasiatnya dalam pemakaiannya pada manusia, maka pengembangan obat tradisional tersebut harus mencakup berbagai tahap pengujian dan pengembangan secara sistematis. Salah satu tahap tersebut adalah pengujian toksisitas. Macam-macam pengujian toksisitasnya, yaitu :

a. Uji toksisitas akut

Dilakukan dengan memberikan zat kimia yang sedang diuji sebanyak satu kali, atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam. Yang perlu dicari disini adalah spektrum toksisitas akut : sistem biologik yang paling peka terhadap calon Fitofarmaka, cara kematian (*mode of death*) dan nilai dosis *lethal median* (LD₅₀), yang dihitung dengan metode statistik baku.

b. Uji toksisitas sub akut

Uji toksisitas sub akut dapat memberikan gambaran tentang toksisitas calon fitofarmaka pada penggunaan berulang untuk jangka waktu relatif lama. Kecenderungan kumulasi dan reversibilitas efek toksik calon fitofarmaka dapat dinyatakan dari hasil uji toksisitas sub akut. Jangka waktu uji pemberian calon fitofarmaka pada toksisitas sub akut kurang lebih 10% dari masa hidup hewan, yaitu tiga bulan untuk tikus dan satu atau dua tahun untuk anjing, tetapi beberapa peneliti menggunakan jangka waktu yang lebih pendek, misalnya, pemberian zat selama 14 dan 28 hari. Pemeriksaan organ-organ vital seperti hepar, ginjal, paru, otak, sistem hematologik, dikerjakan dengan metode standar (baku), termasuk pemeriksaan histopatologik.



c. Uji toksisitas kronik

Uji toksisitas kronik diprioritaskan pada calon fitofarmaka yang penggunaannya berulang/berlanjut dalam jangka waktu sangat lama yaitu selama masa hidup hewan coba atau sekurang-kurangnya sebagian besar dari masa hidupnya, misalnya 18 bulan untuk mencit, 24 bulan untuk tikus, dan 7-10 tahun untuk anjing dan monyet. Uji toksisitas kronik memberikan gambaran tentang toksisitas atau keamanan calon fitofarmaka pada penggunaan dosis lazim secara berulang selama hayat hewan (Anonim, 1996; Loomis, 1978; Lu, 1995).

d. Uji toksisitas spesifik

Macam-macam uji toksisitas spesifik, yaitu :

– Toksisitas pada janin

Disebut juga uji teratogenitas merupakan penelitian khusus tentang pengaruh terhadap janin yang belum dilahirkan. Pemberian selama dalam kandungan atau hanya selama periode organogenesis. Hewan coba yang bisa digunakan yaitu kelinci, tikus, burung dan ikan.

– Mutagenisitas

Uji toksisitas untuk menentukan efek pada sistem kode genetika. Hewan percobaan : lalat buah, sistem model lainnya : bakteri, sel hewan menyusui.

– Toksisitas topikal

Uji toksisitas untuk menentukan efek lokal bahan bila dipakai secara langsung pada kulit dan mata. Hewan percobaan : kelinci putih, marmot putih, dan mencit putih (Anonim, 1996; Koeman, 1987).

– Toksisitas pada darah

Uji toksisitas untuk menentukan efek bahan terhadap sistem hematologik. Hewan percobaan : tikus dan anjing (Anonim, 1996; Lu, 1995).

– Uji Reproduksi

Uji untuk mengevaluasi efek senyawa atas fertilitas dan pemaparan reproduktif umum, selalu menghasilkan informasi tentang efek zat kimia atas morbiditas neonatal dan mortalitas neonatal serta atas teratogenesis. Hewan percobaan : tikus (Loomis, 1978).

– Uji Nerotoksistas

Menentukan efek nerologik dengan perhatian khusus untuk kerusakan degeneratif pada jaringan neronal. Biasanya hanya dilaksanakan jika diperkirakan terdapat nerotoksistas berdasarkan hubungan struktur dengan zat nerotoksis yang dikenal atau alasan lain, misalnya hasil penelitian semikronis atau kronis. Hewan percobaan : ayam (Koeman, 1987).

– Uji Karsinogenesis

Menentukan kerja karsinogen, hanya dilaksanakan jika diperkirakan ada kerja karsinogen berdasarkan atas adanya hubungan struktur dengan karsinogen yang dikenal atau alasan lain, misalnya hasil uji mutagenesis. Hewan percobaan : tikus besar dan kecil, hewan pengerat yang besar, paling sedikit 50 hewan percobaan tiap jenis kelamin baik untuk kontrol maupun untuk tiap kelompok dosis (Koeman, 1987).

Sebagai jalan tengah, perlu selalu dicari dan dikembangkan alternatif-alternatif model dan prosedur uji toksistas yang masih memenuhi persyaratan minimal keamanan obat. Salah satunya yaitu dengan melaksanakan uji secara *in vitro*. Uji *in vitro* dilakukan pada sel yang dikumpulkan dari hewan yang telah diberi bahan yang diuji. Uji semacam ini mencakup proliferasi limfosit dan subpopulasi limfosit.

Uji proliferasi limfosit dilakukan dengan membiakkan limfosit yang dikumpulkan dari limpa hewan yang diberi zat kimia uji dengan adanya mitogen. Tingkat perkembangbiakan tersebut dapat ditentukan oleh penggabungan timidin bertritium pada DNA. Untuk teknik perhitungan subpopulasi limfosit dapat digunakan imunofluoresens, pembentukan roset, histokimia, elektroforesis sel, sitolisis, dan penyortiran sel yang diaktifkan oleh fluoresensi (Lu, 1995).

Penetapan jumlah sel dapat dilakukan dengan berbagai metode penunjuk viabilitas atau penunjuk toksistas yang seringkali didasarkan pada parameter kerusakan membran, gangguan sintesis dan degradasi makromolekul, modifikasi kapasitas metabolisme, serta perubahan morfologi sel.

Penunjukan toksistas yang didasarkan pada kerusakan membran meliputi metode *uptake* zat warna (tripan biru, eritrosin atau nigrosin), kebocoran enzim sitolik, pelepasan Cr^{2+} , dan perubahan mekanisme pompa kalsium. Pada metode

uptake tripan biru, sel yang mengalami kerusakan membran akan menyerap warna sedang sel yang masih utuh bersifat impermeabel dan tidak akan menyerap warna (Suntoro, 1983). Pada penunjuk toksisitas yang didasarkan pada adanya gangguan sintesis dan degradasi makromolekul, digunakan metode penggabungan (^3H)-Leusin atau (^{35}S)-Metionin pada protein, (^3H)-Timidin atau (^3H)-Deoksisisitidin pada DNA dan penggabungan (^3H)-Uridin pada RNA. Untuk modifikasi kapasitas metabolisme dilihat berdasarkan pada kadar ATP, perbandingan NADP/NADPH, kandungan glutathion, konsumsi oksigen, dan laju metabolisme oksidatif dari (^{14}C)-glukosa menjadi $^{14}\text{CO}_2$. Parameter perubahan morfologi sel dapat diketahui dengan menggunakan mikroskop elektron.

Untuk mengetahui viabilitas sel dapat digunakan metode kolorimetrik yaitu suatu metode yang menggunakan suatu substrat yang akan dimetabolisme oleh sel hidup menjadi produk berwarna. Garam tetrazolium MTT (3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5,-diphenyl tetrazolium bromide) yang ditambahkan pada media akan ikut terlibat dalam kerja enzim dehidrogenase. MTT akan direduksi menjadi formazan yang merupakan zat warna ungu yang tidak larut dalam air. Intensitas warna ungu yang terbentuk dapat ditetapkan secara spektrofotometri, yang berkorelasi secara langsung dengan jumlah sel aktif yang melakukan metabolisme, dengan kata lain berkorelasi secara langsung dengan viabilitas sel (Freshney, 1987).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Penggunaan tumbuh-tumbuhan untuk obat di Indonesia telah berlangsung lama dan penggunaannya secara kebetulan atau atas dasar pengalaman yang sifatnya turun temurun. Diantara sekian banyak tanaman obat yang tersebar di Indonesia, tanaman yang mempunyai banyak khasiat adalah *Justicia gendarussa* Burm.f. Salah satunya yaitu digunakan sebagai ramuan yang diminum dua kali dalam satu bulan oleh para pria di daerah Papua untuk menjarangkan kehamilan (Moeso dan Agus, 1985).

Dari penelitian terdahulu diketahui bahwa uji toksisitas akut dan uji teratogenik yang dilakukan pada mencit secara per oral dengan menggunakan fraksi etanol 60% dan fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f disimpulkan aman (Supriatin, 2003). Namun dalam kurun waktu pemakaian 52 hari dapat menyebabkan peningkatan kadar SGPT dan SGOT sehingga mempengaruhi fungsi faal hati. Disamping itu juga terjadi perubahan seluler yang nyata pada organ hati berupa kongesti pembuluh darah dan degenerasi sel hati (Prajogo, 1999). Fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa 100 ppm dan 1000 ppm menunjukkan efek toksisitas hepar pada sistem suspensi hepatosit tikus terisolasi dengan parameter enzim GPT (Wardani, 2003).

Tanaman gandarusa mengandung senyawa yang termasuk golongan flavonoid turunan apigenin, yaitu 6,8-diarabinosilapigenin dan 6-arabinosil-8-silosilapigenin.

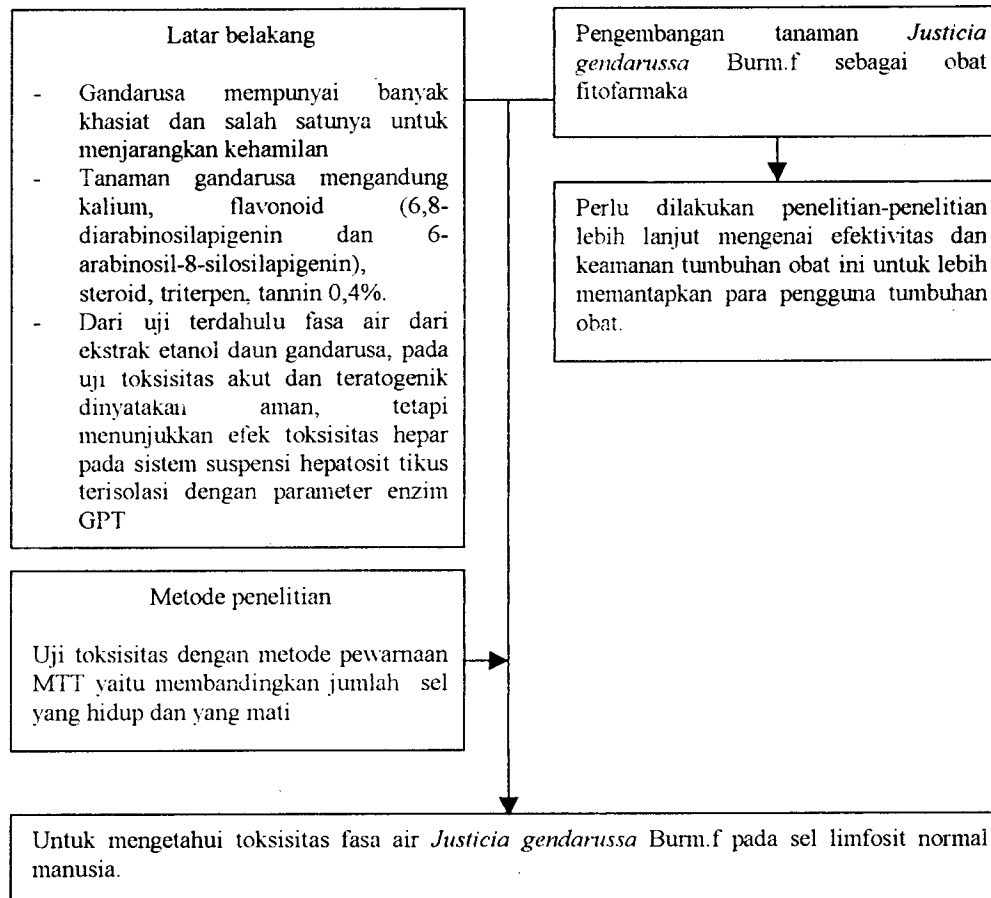
Agar fitofarmaka dapat dipertanggungjawabkan keamanannya dalam pemakaiannya pada manusia, maka harus dilakukan berbagai macam pengujian toksisitas. Dari berbagai macam pengujian toksisitas, salah satunya adalah uji toksisitas spesifik, diantaranya yaitu toksisitas pada darah (Anonim, 1996).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemungkinan adanya sifat toksik dari tanaman gandarusa yang diujikan pada sel limfosit normal manusia dengan menggunakan metode pewarnaan MTT.

Hipotesis yang diajukan yaitu fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f tidak toksik terhadap sel limfosit normal manusia. Pada

penelitian ini digunakan fasa air dari ekstrak etanol daun tanaman gandarusa, karena pelarut tersebut tidak toksik bagi manusia dan pada pelarut air komponen yang tersari adalah flavonoid saja sehingga terdapat dalam jumlah yang besar (Prajogo, 2002).

Dari hasil penelitian ini akan diketahui apakah fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f toksik terhadap sel limfosit normal manusia.



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan tanaman

Bahan yang digunakan adalah daun *Justicia gendarussa* Burm.f yang diambil dari daerah Trawas, Mojokerto pada bulan Januari tahun 2004 dan di determinasi di Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.1.2 Bahan untuk uji toksisitas terhadap sel limfosit

- Sel limfosit normal manusia
- Tripan biru 0,4% dalam larutan NaCl 0,9% (Sigma)
- Media RPMI 1640 : RPMI 1640 (Sigma), natrium bikarbonat (Sigma) dan Hepes (Sigma)
- Media kultur sel : Media RPMI 1640 (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) 10% v/v (Gibco), penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), dan Fungison 0,5% v/v (Gibco)
- Ficoll-Hypaque™
- MTT 5 mg/mL dalam PBS
- Larutan PBS (Phosphat Buffer Saline)
- Reagen *stopper* : Sodium Dodesil Sulfat 10% dalam 0,1 N HCl
- Aquabidest steril

4.1.3 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah :

- | | |
|--------------------|--------------------|
| - n-Heksana teknis | - Kloroform teknis |
| - Etanol 60 % | - Aquadest |

4.2 Alat Penelitian

4.2.1 Alat ekstraksi

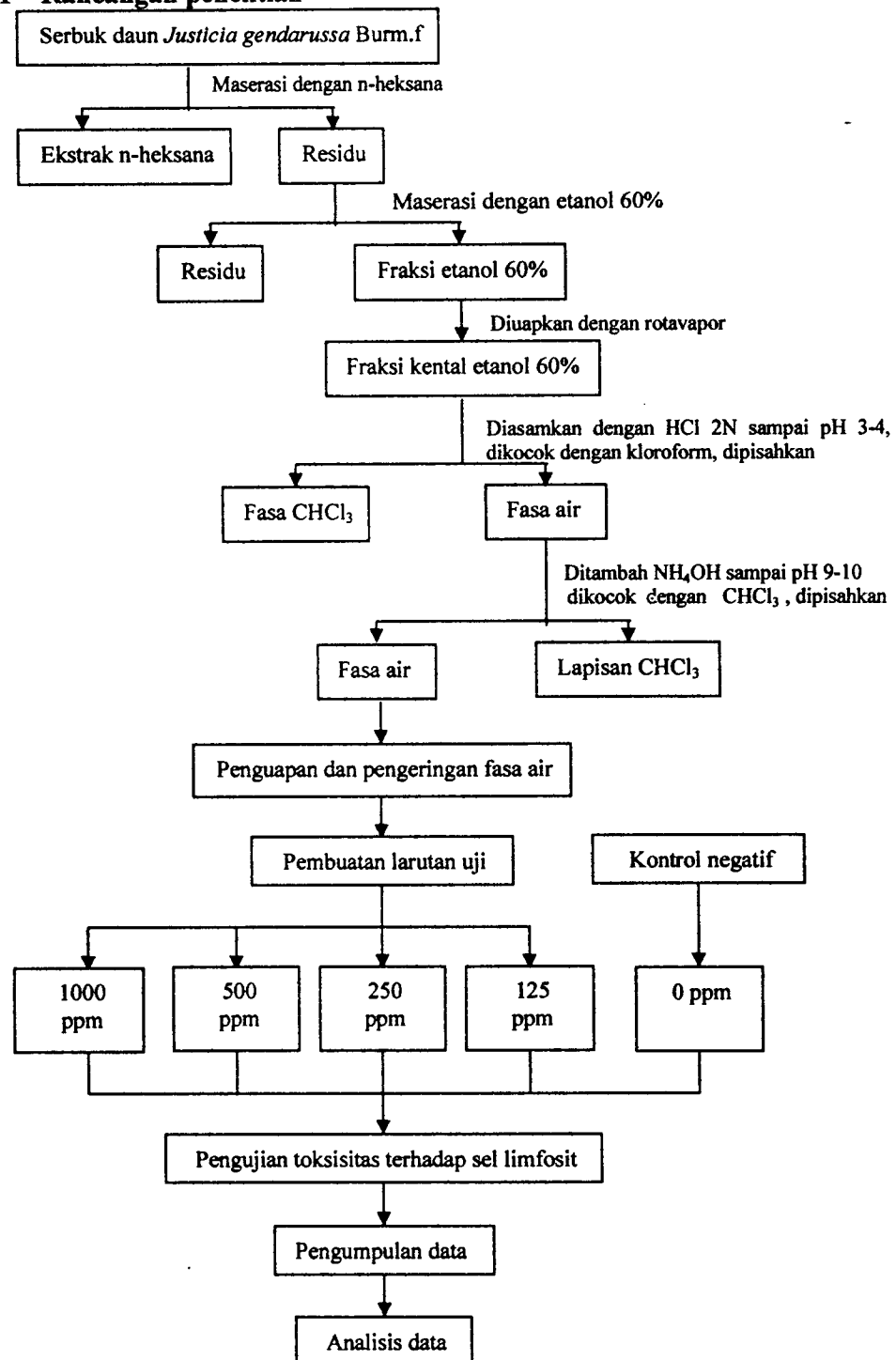
- | | |
|--------------------------|----------------|
| - Maserator dan pengaduk | - Rotavapour |
| - Penyaring Buchner | - Corong pisah |

4.2.2 Alat untuk uji toksisitas terhadap sel limfosit

- S spuit injeksi steril
- Tabung *conical* steril (Nunclon)
- Sentrifus
- Pipet tetes steril
- Neubauer Haemocytometer
- 96-well plate
- Mikropipet ukuran 200 μL – 1 mL, 50 μL – 200 μL , dan 5 μL – 50 μL (Gilson)
- Tip biru dan kuning steril
- Neraca analitik
- Inkubator orbi C, 5% CO_2
- ELISA *Reader*

4.3 Cara kerja

4.3.1 Rancangan penelitian



Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

4.3.2 Metode pembuatan ekstrak

a. Pembuatan serbuk daun

Bagian tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f, yaitu bagian daun disortasi basah agar terpisah dari kotoran-kotoran yang melekat padanya lalu dicuci sampai bersih. Setelah itu dilakukan perajangan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena sinar matahari langsung sampai kering. Setelah itu disortasi kering kemudian diserbuk.

b. Pembuatan fase air

Serbuk daun tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f diekstraksi dengan pelarut n-heksana secara maserasi dan diaduk, setelah pengadukan ekstrak ditampung. Setiap kali menampung, pelarut n-heksana yang ditambahkan dalam jumlah yang sama seperti maserasi pertama. Maserasi dilakukan tiga kali dengan pelarut n-heksana untuk memisahkan kandungan lemak dan klorofil dari daun gandarusa. Setelah penampungan terakhir dengan n-heksana, residu hasil maserasi dikeringkan dengan jalan diangin-anginkan sampai pelarut n-heksana betul-betul menguap.

Residu yang telah kering dimaserasi dengan etanol 60%, setelah pengadukan kemudian ditampung. Setiap kali menampung pelarut etanol 60% yang ditambahkan dalam jumlah yang sama seperti maserasi pertama. Maserasi dilakukan tiga kali, ekstrak etanol yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sampai terbentuk massa yang kenyal.

Ekstrak kental tersebut kemudian diencerkan dengan aquadest dan diasamkan dengan HCl 2N sampai pH 3-4, kemudian ekstrak cair tersebut dipartisi dengan kloroform sama banyak di dalam corong pisah. Partisi dilakukan tiga kali dan diambil fasa airnya. Fasa air yang didapat dibasakan dengan NH_4OH sampai pH 9-10 kemudian dilakukan partisi kloroform-air. Fasa air dipisahkan dari fasa kloroform, di rotavapor kemudian dikeringkan dengan *freeze drier*. Fasa air yang didapat kemudian disebut dengan fasa air yang akan digunakan untuk uji toksikologi.

4.3.3 Preparasi sel limfosit normal manusia

Darah segar diencerkan dengan media RPMI dengan komposisi 1 : 3 dalam tabung *conical* steril. Campuran darah dengan media RPMI ditambah Ficoll-Hypaque™ dengan perbandingan 1 :1, akan terjadi dua lapisan. Sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama \pm 10 menit. Akan terjadi tiga lapisan, dimana lapisan atas merupakan media RPMI, lapisan tengah yaitu sel limfosit, dan lapisan bawah merupakan plasma darah. Lapisan tengah yaitu sel limfosit diambil dan dipindahkan kedalam tabung *conical* steril yang telah berisi media RPMI sebanyak 10 mL, diresuspensi kemudian disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama \pm 10 menit, supernatan dibuang. Pencucian ini diulangi tiga kali. Pelet yang didapat ditambah dengan media kultur RPMI sebanyak 1 mL, kemudian diresuspensi. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan hemositometer. Suspensi sel ditambah dengan sejumlah media kultur RPMI sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 2×10^5 /mL. Setelah dicapai konsentrasi tersebut maka sel siap digunakan untuk penelitian.

4.3.4 Uji viabilitas sel

1. Diambil 10 μ L suspensi sel tersebut diatas, dipindahkan kedalam tabung reaksi kecil, kemudian ditambahkan media kultur sebanyak 40 μ L dan diresuspensi
2. Ditambahkan larutan tripan biru 0,4% sebanyak 50 μ L kedalam tabung tersebut.
3. Dipipet larutan tersebut sebanyak 10 μ L, kemudian diletakkan diatas hemositometer yang telah disiapkan. Gelas penutup diletakkan di atas kamar penghitung sehingga menutupi kedua kamar penghitung. Cara meletakkan pipet ditempatkan pada gelas penutup dan larutan dikeluarkan.
4. Kamar penghitung diletakkan di bawah mikroskop dan penghitungan dilakukan dengan pembesaran 100 X. Sel yang mati akan terwarnai tripan biru dan yang hidup tidak terwarnai (jernih) dihitung, dan ditentukan viabilitasnya dengan cara :

$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Jumlah sel hidup}}{\text{Jumlah sel total}} \times 100$
--

Cara menghitung sel dengan Hemositometer

- Dihitung jumlah sel limfosit yang terdapat dalam daerah 1,2,3,4. Luas $A = 0,0625 \text{ mm}^2$ (luas seluruhnya = 9 mm^2), tebal $0,1 \text{ mm}$. Volume dari $16A = 16 \times 0,0625 \times 0,1 \times 1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$.
- Sel-sel yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kiri dan atas dihitung, sedangkan yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kanan dan bawah tidak dihitung atau sebaliknya. Misalnya yang terdapat dalam $16A = N$, volume $16A = 10^{-4} \text{ mL}$, maka jumlah sel limfosit dalam $1 \text{ mL} = (1:10^{-4}) \times N = 10^4 N \text{ sel}$. Jadi jumlah sel limfosit adalah $N \times 10^4 \text{ sel/mL}$.

4.3.5 Pembuatan larutan uji

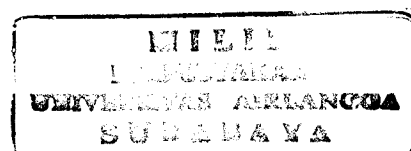
Pemilihan konsentrasi larutan uji berdasarkan konsentrasi yang digunakan untuk uji sitotoksik *Brassica oleracea var capitata* dan *Brassica oleracea var italica* terhadap kultur sel line Rhabdomyosarcoma, yaitu 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 125 ppm (Hakim, 2000).

a. Pembuatan larutan induk

Ditimbang 25 mg fasa air dari ekstrak etanol, dilarutkan dalam 5 mL aquabidest. Diperoleh konsentrasi 5000 ppm.

b. Pembuatan larutan uji

1. Dipipet 400 μL larutan induk kemudian ditambahkan 600 μL media kultur, lalu dikocok sampai homogen. Diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Kemudian diambil 100 μL , ditambahkan kedalam kultur sel limfosit tepat 100 μL , didapatkan konsentrasi 1000 ppm.
2. Dipipet 200 μL larutan induk kemudian ditambahkan 800 μL media kultur, lalu dikocok sampai homogen. Diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian diambil 100 μL , ditambahkan kedalam kultur sel limfosit tepat 100 μL , didapatkan konsentrasi 500 ppm.
3. Dipipet 100 μL larutan induk kemudian ditambahkan 900 μL media kultur, lalu dikocok sampai homogen. Diperoleh konsentrasi 500 ppm. Kemudian diambil 100 μL , ditambahkan kedalam kultur sel limfosit tepat 100 μL , didapatkan konsentrasi 250 ppm.



4. Dipipet 50 μL larutan induk kemudian ditambahkan 950 μL media kultur, lalu dikocok sampai homogen. Diperoleh konsentrasi 250 ppm. Kemudian diambil 100 μL , ditambahkan kedalam kultur sel limfosit tepat 100 μL , didapatkan konsentrasi 125 ppm.

4.3.6 Pembuatan larutan kontrol negatif

Dipipet media kultur RPMI 100 μL dan ditambahkan pada sel limfosit tepat 100 μL .

4.3.7 Uji toksisitas pada kultur sel

Sel didistribusikan kedalam masing-masing sumuran sebanyak 100 μL . Dimasukkan larutan uji dan media kultur RPMI sebanyak 100 μL ke dalam sumuran yang telah berisi sel dengan replikasi sebanyak tiga kali. Diinkubasi dalam inkubator CO_2 yang berisi 95% O_2 dan 5% CO_2 dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pada waktu 4 jam sebelum masa inkubasi berakhir, masing-masing sumuran ditambah dengan 10 μL MTT 5 mg/mL dalam larutan PBS. Kemudian diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT dan membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan reagen *stopper*, yaitu larutan SDS 10% dalam HCl 0,1N sebanyak 100 μL setiap sumuran, kemudian dibiarkan pada suhu kamar selama semalam. Kerapatan optik (OD atau *optical density*) dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

4.3.8 Evaluasi hasil uji toksisitas

Dari masing-masing konsentrasi dihitung % sel matinya :

$$\% \text{ Sel mati} = \frac{\text{OD}_{\text{kontrol negatif}} - \text{OD}_{\text{senyawa uji}}}{\text{OD}_{\text{kontrol negatif}}} \times 100\%$$

4.4 Analisis Data

Data hasil percobaan dianalisis dengan menggunakan uji anava satu arah untuk mengetahui pengaruh penambahan fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f terhadap persentase sel limfosit mati.

4.4 Analisis Data

Data hasil percobaan dianalisis dengan menggunakan uji anava satu arah untuk mengetahui pengaruh penambahan fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f terhadap persentase sel limfosit mati.

Hipotesis statistik yang diajukan adalah :

H_0 = Tidak ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel limfosit normal manusia antar kelompok larutan uji.

H_a = Ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel limfosit normal manusia antar kelompok larutan uji.

Untuk menilai hipotesis statistik lebih dulu dihitung harga p hitung. Harga p hitung akan dibandingkan dengan harga tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Bila harga p hitung lebih kecil dari harga $\alpha = 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima, berarti ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel limfosit normal manusia antar kelompok larutan uji, dan bila harga p hitung lebih besar dari harga $\alpha = 0,05$ maka H_0 diterima dan H_a ditolak, berarti tidak ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel limfosit normal manusia antar kelompok larutan uji.

Untuk mengetahui kelompok larutan uji yang berbeda selanjutnya dilakukan analisis LSD (*Least Significant Difference*).

BAB V
HASIL PENELITIAN

5.1 Tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f

Tanaman diperoleh di daerah Trawas, Mojokerto.



Gambar 5.1 Tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f

5.2 Pembuatan fasa air dari ekstrak etanol

Hasil pembuatan fasa air dari ekstrak etanol serbuk daun tanaman gandarusa ditunjukkan pada tabel di bawah ini

Tabel V.1 Berat hasil ekstraksi daun gandarusa

Serbuk daun	Fraksi etanol 60%	Fasa air
3 kg	975,72 g	393,14 g (13,10 %)

5.3 Hasil pembuatan larutan uji fasa air

Ditimbang fasa air 0,0252 g dilarutkan dalam aquabidest sampai volume 5 mL diperoleh konsentrasi 5040 ppm dan digunakan sebagai larutan induk, dari larutan induk tersebut dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1008 ppm, 504 ppm, 252 ppm, dan 126 ppm.

5.4 Percobaan uji toksisitas

5.4.1 Perhitungan jumlah sel limfosit dan uji viabilitas

Setelah preparasi sel, dilakukan perhitungan jumlah sel limfosit dan uji viabilitas dengan hemositometer dan pewarnaan yang digunakan adalah biru tripan. Hasil perhitungan ditunjukkan dalam tabel di bawah ini.

Tabel V.2 Perhitungan jumlah sel limfosit secara mikroskopis dengan menggunakan pewarnaan tripan biru.

	Jumlah sel ($\times 10^5$ / mL)	Viabilitas sel
Hidup	123	71,10 %
Mati	50	
Total	173	

5.4.2 Uji toksisitas fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa pada sel limfosit normal manusia

Uji toksisitas fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa pada sel limfosit normal manusia dengan metode pewarnaan MTT diperoleh data pada tabel dibawah ini.

Tabel V.3 Data pengukuran kerapatan optik MTT hasil pewarnaan sel limfosit karena pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa terhadap sel limfosit dengan alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Kerapatan optik				
		1	2	3	Rata-rata	SD
Kontrol	0	0,388	0,370	0,329	0,362	0,030
Fasa air	126	0,367	0,355	0,331	0,351	0,018
Fasa air	252	0,350	0,407	0,312	0,356	0,048
Fasa air	504	0,335	0,315	0,330	0,327	0,010
Fasa air	1008	0,328	0,316	0,298	0,314	0,015

Tabel V.4 Persentase sel mati dari sel limfosit karena pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% sel mati				
		1	2	3	Rata-rata	SD
Kontrol	0	0	0	0	0	0
Fasa air	126	5,412	4,054	0 *	4,733	0,960
Fasa air	252	9,794	0 *	5,167	7,480	3,272
Fasa air	504	13,660	14,865	0 *	14,262	0,852
Fasa air	1008	15,464	14,595	9,423	13,161	3,266

Keterangan : * Data tidak digunakan

5.5 Analisis data

5.5.1 Uji viabilitas sel limfosit

Hasil penentuan viabilitas sel limfosit menunjukkan harga viabilitas 71,10 %. Viabilitas hasil isolasi sel cukup baik sehingga dapat dipergunakan untuk percobaan.

5.5.2 Uji toksisitas fasa air dari ekstrak etanol daun gendarusa terhadap sel limfosit normal manusia

Untuk analisis data digunakan analisis statistik anava satu arah untuk mengetahui pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gendarusa terhadap toksisitas sel limfosit normal manusia . Hasil perhitungan ditunjukkan dalam tabel dibawah ini.

Tabel V.5 Tabel anava persentase sel mati dari sel limfosit karena pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gendarusa

Sumber variasi	SS	df	MS	F	Sig.
Antar perlakuan	371,162	4	92,790	19,282	,001
Dalam perlakuan	33,685	7	4,812		
Total	404,847	11			

Dari hasil analisis terhadap fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f pada tabel di atas diperoleh harga p lebih kecil dari 0,05. Dengan demikian Ho ditolak dan Ha diterima yang berarti ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel limfosit normal manusia antar kelompok larutan uji.

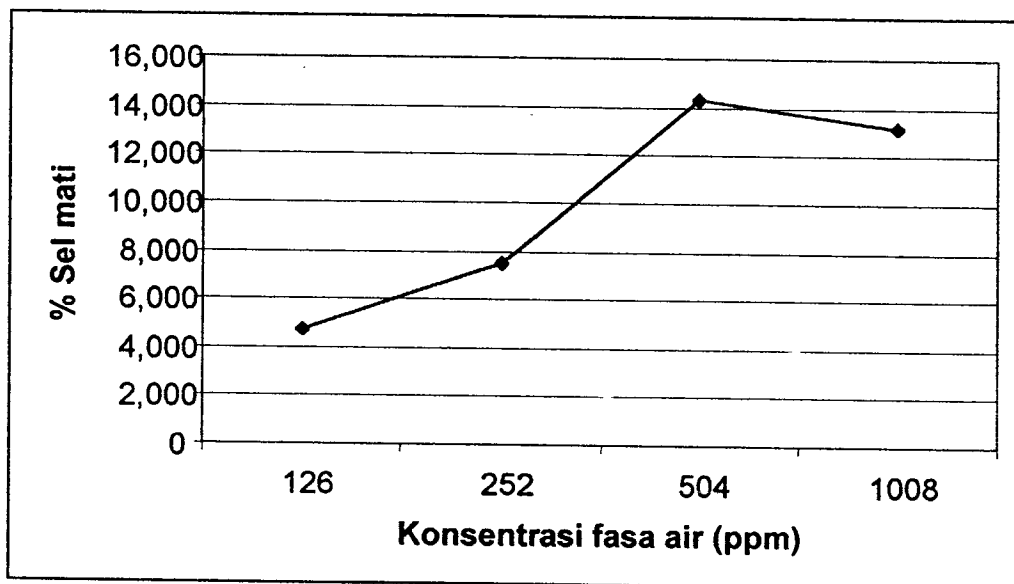
Selanjutnya untuk mengetahui kelompok larutan uji mana saja yang berbeda maka dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*). Hasil yang diperoleh dengan uji LSD tertera pada tabel berikut :

Tabel V.6 Hasil analisis uji LSD fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa

Konsentrasi (ppm)	0	126	252	504	1008
0	-	4,733	7,480*	14,262*	13,161*
126		-	2,747	9,529*	8,428*
252			-	6,782*	5,680*
504				-	1,102
1008					-

* Ada perbedaan bermakna

Dibawah ini tertera grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji dengan persentase sel limfosit yang mati.



Gambar 5.2 Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji vs rata-rata persentase sel limfosit mati setelah perlakuan

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada proses maserasi yang diselingi dengan pengadukan daun tanaman gandarusa, pertama didapatkan fraksi etanol 60% yang mengandung flavonoid, yang diperkirakan dapat memberikan efek, namun masih bercampur dengan komponen lain, khususnya alkaloid. Sebagian dari fraksi etanol 60% yang telah diuapkan kemudian diasamkan, sehingga alkaloid yang ada pada fraksi etanol 60% yang berbentuk base dan terikat dengan komponen lain akan berubah menjadi bentuk garam. Kemudian dilakukan partisi dengan kloroform, dan dipisahkan fasa air dan fasa kloroformnya. Fasa air, yang mengandung alkaloid bentuk garam, dibasakan kembali sehingga alkaloid akan kembali menjadi bentuk base, dan dipartisi lagi dengan kloroform, lalu dipisahkan fasa air dan fasa kloroformnya. Tujuan dari tahapan ini adalah untuk menyeragamkan bentuk alkaloid yang akan dipisahkan atau dibuang (bentuk base), sehingga diharapkan alkaloidnya dapat tertarik oleh kloroform semua. Fasa air yang terbentuk inilah yang digunakan sebagai sampel penelitian yang telah bebas dari alkaloid.

Tahap selanjutnya dengan membuat kontrol dan larutan uji dari ekstrak yang sudah disterilkan dengan cara filtrasi (pori membran filter = 0,22 μm). Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara menambahkan media kultur RPMI sebanyak 100 μL pada sel limfosit tepat 100 μL . Tujuan dari dibuatnya kontrol negatif adalah untuk menunjukkan bahwa media yang digunakan serta kondisi yang dibuat tidak menyebabkan kematian sel. Larutan uji dibuat dengan konsentrasi 126 ppm, 252 ppm, 504 ppm dan 1008 ppm.

Untuk pelaksanaan percobaan uji toksisitas fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa digunakan sel limfosit yang diisolasi dari darah orang dewasa. Sel limfosit ini dapat disebut sebagai sel primer karena tidak diperlakukan kultur sel lebih lanjut.

Preparasi limfosit untuk dikultur dengan cara mengapungkan limfosit di atas campuran *Ficoll* dan *histopaque*. Proses preparasi sel dilakukan dengan kondisi aseptis didalam LAFC (Laminar Air Flow Cabinet) dengan media dan peralatan

yang steril untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur. Hal ini penting untuk mempertahankan kualitas hasil preparasi.

Jumlah sel kemudian dihitung menggunakan hemositometer dengan pewarna tripan biru untuk membedakan sel hidup dan sel mati, dimana sel yang hidup tampak jernih dan mengkilap karena membran sel masih utuh dan tidak menyerap pewarna sehingga sel mudah dihitung. Hasil penentuan viabilitas sel limfosit menunjukkan harga viabilitas 71,10 %. Agar diperoleh interpretasi hasil yang akurat, viabilitas seharusnya di atas 80% (Anonim^e, 2005). Faktor yang mempengaruhi hasil viabilitas sel adalah preparasi sel dan donor sel.

Sel limfosit yang akan digunakan untuk percobaan dibuat dengan konsentrasi 2×10^5 /mL, kemudian didistribusikan kedalam masing-masing sumuran sebanyak 100 μ L. Dimasukkan larutan uji dan media kultur RPMI sebanyak 100 μ L ke dalam sumuran yang telah berisi sel dengan replikasi sebanyak tiga kali. Diinkubasi dalam inkubator CO₂ yang berisi 95% O₂ dan 5% CO₂ dengan suhu 37⁰ C selama 24 jam. Fungsi dari gas CO₂ ini adalah sebagai dapar (bersama-sama dengan bikarbonat yang terdapat dalam media) untuk menjaga pH optimal pertumbuhan sel. Inkubasi dilakukan pada suhu 37⁰ C, karena suhu tersebut merupakan suhu yang optimal untuk pertumbuhan sel.

Untuk menghitung jumlah sel yang hidup pada penelitian ini digunakan reagen MTT yang merupakan garam tetrazolium. Prinsip pewarnaan MTT yang digunakan yaitu proses reduksi garam tetrazolium yang larut air menjadi formazan berwarna yang tidak larut air, dapat terjadi dengan bantuan enzim dehidrogenase yang terdapat pada sel. Dengan demikian aktivitas enzim dan jumlah formazan yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang hidup dan jumlah formazan yang terbentuk dapat diketahui dengan pembacaan ELISA *reader*. Sebelum dilakukan pembacaan, tiap-tiap sumuran ditambahkan SDS 10% untuk mendenaturasi protein menjadi unit rantai polipeptida dan membentuk kompleks SDS-polipeptida. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang optimum yaitu pada panjang gelombang 550 nm (Lestari, 2002).

Hasil percobaan toksisitas untuk fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f menunjukkan bahwa persentase sel limfosit yang mati setelah perlakuan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi larutan uji dari

konsentrasi 126 ppm sampai 504 ppm dan sedikit menurun pada konsentrasi 1008 ppm. Pada konsentrasi 126 ppm persentase sel mati rata-rata sebanyak 4,733 ; pada konsentrasi 252 ppm sebanyak 7,480 ; pada konsentrasi 504 ppm sebanyak 14,262 ; dan pada konsentrasi 1008 ppm sebanyak 13,161. Pada konsentrasi 126 ppm, 252 ppm, dan 504 ppm ada kerapatan optiknya (OD) yang melebihi kontrol negatif sehingga persentase sel matinya dianggap nol. Adanya penyimpangan ini karena terjadinya kenaikan intensitas warna yang tidak terduga, yang terjadi bila reagen yang disimpan pada suhu rendah kemudian dimasukkan dalam *tissue culture cluster 96* lalu diinkubasi pada suhu 37⁰ C, namun dapat juga disebabkan faktor lain (Burgess, 1995).

Pengolahan data hasil percobaan menggunakan metode statistik analisis varian satu arah. Dari perhitungan diperoleh harga p lebih kecil dari 0,05 , yaitu 0,001 berarti ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel limfosit normal manusia antar kelompok uji. Untuk mengetahui kelompok larutan uji mana saja yang memberikan perbedaan hambatan pertumbuhan sel tersebut analisis statistik dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Hasil uji LSD menunjukkan bahwa konsentrasi 252 ppm, 504 ppm dan 1008 ppm memberikan hambatan pertumbuhan sel yang bermakna dibandingkan dengan kontrol negatif. Artinya ada aktivitas penghambatan pertumbuhan pada sel limfosit oleh fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa.

Untuk mengetahui potensi toksisitas atau potensi penghambatan yang diberikan oleh larutan uji, maka data persentase sel limfosit mati dianalisis dengan menggunakan analisis probit, dan selanjutnya dibandingkan dengan standar yang ditentukan OSHA (Occupational Safety and Health Administration) untuk mengetahui tingkat toksisitasnya, dimana $LC_{50} > 20$ ppm (inhalasi) bersifat nontoksik (anonim^b, 2005). Dari hasil uji analisis probit didapatkan harga LC_{50} sebesar 3215,7242 ppm, sehingga dapat disimpulkan bahwa fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f tidak memiliki aktivitas toksik dan diketahui juga bahwa fasa air dari ekstrak etanol gandarusa dapat membunuh 50% dari seluruh populasi sel limfosit manusia pada kadar 3215,7242 ppm.

Pada penelitian toksisitas sebelumnya, fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa 100 ppm dan 1000 ppm menunjukkan efek toksisitas hepar pada sistem

suspensi hepatosit tikus terisolasi dengan parameter enzim GPT (Wardani, 2003). Untuk mengetahui keamanan tanaman gandarusa ini bagi manusia maka perlu dilakukan uji toksisitas pada hepar terhadap hewan yang lebih tinggi tingkatannya atau yang mirip manusia seperti primata. Akan tetapi, pengujian dengan menggunakan sel lain yaitu sel limfosit, diperoleh hasil non toksik. Dengan uji-uji toksisitas yang telah dilakukan, masih kurang cukup untuk membuktikan bahwa fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa aman untuk digunakan, sehingga untuk menjamin keamanan dari penggunaan tanaman gandarusa ini, maka perlu dilakukan uji toksisitas spesifik yang lain, seperti uji mutagenik untuk mengetahui pengaruh fasa air dari ekstrak etanol daun gandarusa terhadap pasangan basa DNA dan uji karsinogenik untuk mengetahui apakah gandarusa dapat menyebabkan pembentukan neoplasma atau mengubah neoplasma menjadi kanker. Tanaman ini digunakan dalam jangka waktu yang lama sehingga uji-uji tersebut perlu dilakukan.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil percobaan toksisitas terhadap kultur sel limfosit normal manusia dengan menggunakan bahan uji fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f dengan metode pewarnaan MTT dapat disimpulkan bahwa fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa* Burm.f mempunyai harga LC₅₀ sebesar 3215,7242 ppm.

7.2 Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk dilakukan uji toksisitas spesifik yang lain, misalnya uji mutagenik dan karsinogenik agar keamanannya benar-benar dapat dipertanggungjawabkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1996. *Kumpulan Perundang-undangan Bidang Sediaan Farmasi, Makanan, Alat Kesehatan dan Bahan Berbahaya (Umum)*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Depkes RI. Hal 308-313
- Anonim^a. 2005. *Australian Naturopathic Network*.
<http://www.ann.com.au/herbs/Monographs/Hemidesmus.htm> diakses pada tanggal 8 Agustus 2005
- Anonim^b. 2005. *Bio T Product Technical Information*.
<http://www.biochemsys.com/technical.html> diakses pada tanggal 29 juli 2005
- Anonim^c. 2005. *Gender dan Kontrasepsi*.
<http://hqweb01.bkkbn.go.id/hqweb/pria/artikel01-9I.html> diakses pada tanggal 3 Maret 2005
- Anonim^d. 2005. *In vitro investigation of immunomodulatory effects of herbal products*. New york : SUNY Upstate Medical University
<http://www.positivehealth.com/permit/Updates/rudherb3.htm> diakses pada tanggal 7 Agustus 2005
- Anonim^e. 2005. *Standards For Histocompatibility Testing*.
[http://66.102.7.104/search?q=cache:TnAPUzApE68J:www.efiweb.org/pdf/standards_530.pdf+standard+%2B+cell+viability+value+80%25+%2B+cytotoxicity+test\(pdf\)&hl=id](http://66.102.7.104/search?q=cache:TnAPUzApE68J:www.efiweb.org/pdf/standards_530.pdf+standard+%2B+cell+viability+value+80%25+%2B+cytotoxicity+test(pdf)&hl=id) diakses pada tanggal 5 September 2005
- Baratawidjaja, Karmen garna. 2000. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-4. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Burgess, G. W., 1995. *Teknologi ELISA Dalam Diagnosis Dan Penelitian*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press
- Darmansjah. Toksikologi. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hal 762-767
- Freshney, I.R., 1987, *Cultur of Animal Cell: A Manual Basic of Technique*, 2nd ed, New York : Alan R. Liss Inc, p 227-292
- Freshney, I.R., 1987, *Animal Cell Culture a practical approach*. Washington : IRL press
- Hakim, Abdul.2000. Uji Sitotoksik *Brassica oleracea var capitata* dan *Brassica oleracea var italica* Terhadap Kultur Sel Line Rhabdomyosarcoma Dengan Metode Pewarnaan MTT. *Skripsi*. Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya

- Heyne, K., 1987, *Tanaman Berguna Indonesia*, ed II, Terjemahan Badan Litbang, Jakarta, p 1073-1074
- Janeway, C.A.Jr., Schlomchik, M.J., Travers, P., walport, M., 2001, *Immunobiology 5, The Immune System in Health and Disease*, Churchill Livingstone : Garland Publishing-Taylor and Francis Group
- Koeman, J.H., 1987. *Pengantar Umum Toksikologi*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press. Hal. 76-80
- Kresno, Siti boedina.1996. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Lestari, Sri. 1997. Pengaruh ekstrak diklormetan dan metanol daun *Gendarussa vulgaris nesses* terhadap aktivitas enzim hialuronidase spermatozoa pada kumulus ooforus ovum manusia in vitro. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Lestari, Sismindari, dan Sulistyani, N., 2002. Uji Sitotoksitas Ekstrak Gubal dan Fraksi Protein Aktif 60% Umbi *Allium sativum* L. (Bawang putih) Terhadap Sel Limfosit Secara Invitro. *Media Farmasi Jurnal ilmu farmasi*. Vol. I. No. I. Yogyakarta : Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. Hal 40-46
- Loomis, Ted A., 1978. *Toksikologi Dasar*. Edisi ketiga. Semarang : IKIP Semarang Press. Hal 225-272
- Lu, Frank C. 1995. *Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Risiko*. Edisi kedua. Jakarta : UI Press. Hal 85-101
- Marliana, D.M., 2001. Uji Toksisitas Ekstrak Air *Gendarussa vulgaris* Nees pada Mencit Jantan. *Skripsi*. Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Prajogo, B.E.W., Widjiati dan Epy, M.I., 1999. *Uji Toksisitas Daun Gendarussa vulgaris Nees terhadap Gambaran Darah Histopatologi Hati, Ginjal dan Usus Mencit Jantan*. Lembaga Penelitian Unair Surabaya
- Prajogo, B.E.W., 2002. Aktivitas Antifertilitas Flavonoid Daun *Justicia gendarussa* Burm.f. *Disertasi*. Surabaya : Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Hal. 164
- Supriatin. 2003. Uji Toksisitas Akut dan Teratogenik Fraksi Etanol 60% dan Fasa Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees pada Mencit. *Skripsi*. Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Steenis, V., C.G.G.J., 1978. *Flora Untuk Sekolah di Indonesia*. Jakarta : Pradnya Paramita. Hal. 393-4148

- Wardani, Yulia ika. 2003. Uji Toksisitas Hepar Fraksi Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees pada Sistem Suspensi Hepatosit Tikus Terisolasi dengan Parameter Enzim GPT. *Skripsi*. Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Zhang, LL., et al. 2004. *Therapeutic effect of glucosides of Cheanomeles speciosa on collagen-induced arthritis in mice*. China : Anhui Medical University <http://www.chinaphar.com/1671-4083/25/1495.htm> diakses pada tanggal 8 Agustus 2005

Lampiran 1

Kandungan Media RPMI 1640

Kandungan Media RPMI 1640 (mg/L)

1. Asam amino, antara lain :

1. L-alanine (free base)	200	11. L-leucine	50,0
2. L-asparagine	50,0	12. L-lisine HCl	40,0
3. L-aspartic acid	20,0	13. L-methionine	15,0
4. L-cystine	50,0	14. L-phenylalanine	15,0
5. L-glutamic ac	20,0	15. L-proline	20,0
6. L-glutamine	300	16. L-serine	30,0
7. Glycine	10,0	17. L-threonine	20,0
8. L-histidine (freebase)	15,0	18. L-tryptophan	5,0
9. L-hydroxy-proline	20,0	19. L-tyrosine	20,0
10. L-isoleucine	50,0	20. L-valine	20,0

2. Vitamin, antara lain :

1. Biotine	0,200	7. Folic acid	1,00
2. D-Ca pantothenate	0,250	8. I-inositol	35,00
3. Choline chloride	3,00	9. Nicotinamide	1,00
4. Thyamine HCl	1,00	10. Riboflavine	0,20
5. Pyridoxine HCl	1,00	11. Vitamine B12	0,005
6. P-amin benzo acid	1,00		

3. Garam-garam anorganik, antara lain :

1. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100	4. KCl	400
2. $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	1,51	5. NaCl	6,00
3. $CaNO_3 \cdot 4H_2O$	100	6. $NaHCO_3$	2,20

4. Komponen lain, seperti :

1. D-glucose	2,0	3. Phenol Red	5,0
2. Glutathione(reduced)	1,0	4. CO_2 (gas phase)	5%

(Freshney, 1987)

Lampiran 2

Hasil analisis anava fasa air dari ekstrak etanol daun *Justicia gendarussa*

Burm.f

Oneway

**Descriptives
SELMATI**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	3	,00000	,00000	,00000	,00000	,00000	,000	,000
126	2	4,73300	,96025	,67900	-3,89451	13,36051	4,054	5,412
252	2	7,48050	3,27178	2,31350	-21,91530	36,87630	5,167	9,794
504	2	14,26250	,85206	,60250	6,60701	21,91799	13,660	14,865
1008	3	13,16067	3,26595	1,88559	5,04761	21,27373	9,423	15,464
Total	12	7,70283	6,06666	1,75129	3,84826	11,55740	,000	15,464

**ANOVA
SELMATI**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	371,162	4	92,790	19,282	,001
Within Groups	33,685	7	4,812		
Total	404,847	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SELMATI

LSD

		Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval			
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound		
(I) KADAR	(J) KADAR	0	126	-4,73300	2,00254	,050	-9,46826	2,2595E-03
		252	-7,48050*	2,00254	,007	-12,21576	-2,74524	
		504	-14,26250*	2,00254	,000	-18,99776	-9,52724	
		1008	-13,16067*	1,79113	,000	-17,39601	-8,92532	
126	0	4,73300	2,00254	,050	-2,25953E-03	9,46826		
		252	-2,74750	2,19367	,251	-7,93472	2,43972	
		504	-9,52950*	2,19367	,003	-14,71672	-4,34228	
		1008	-8,42767*	2,00254	,004	-13,16293	-3,69241	
252	0	7,48050*	2,00254	,007	2,74524	12,21576		
		126	2,74750	2,19367	,251	-2,43972	7,93472	
		504	-6,78200*	2,19367	,018	-11,96922	-1,59478	
		1008	-5,68017*	2,00254	,025	-10,41543	-,94491	
504	0	14,26250*	2,00254	,000	9,52724	18,99776		
		126	9,52950*	2,19367	,003	4,34228	14,71672	
		252	6,78200*	2,19367	,018	1,59478	11,96922	
		1008	1,10183	2,00254	,599	-3,63343	5,83709	
1008	0	13,16067*	1,79113	,000	8,92532	17,39601		
		126	8,42767*	2,00254	,004	3,69241	13,16293	
		252	5,68017*	2,00254	,025	,94491	10,41543	
		504	-1,10183	2,00254	,599	-5,83709	3,63343	

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 3

Analisis Probit Fasa Air dari Ekstrak Etanol Daun *Justicia gendarussa*

Burm.f

Probit

```

* * * * * P R O B I T   A N A L Y S I S * * * * *
DATA Information
      9 unweighted cases accepted.
      0 cases rejected because of missing data.
      0 cases are in the control group.
MODEL Information
      ONLY Normal Sigmoid is requested.
      Parameter estimates converged after 12 iterations.
      Optimal solution found.
Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept +
BX):
      Regression Coeff.   Standard Error   Coeff./S.E.
      KADAR              ,00048           ,00016           3,03564
      Intercept          -1,54013         ,10980          -14,02716
Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 10,172   DF = 7   P
= ,179

```

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

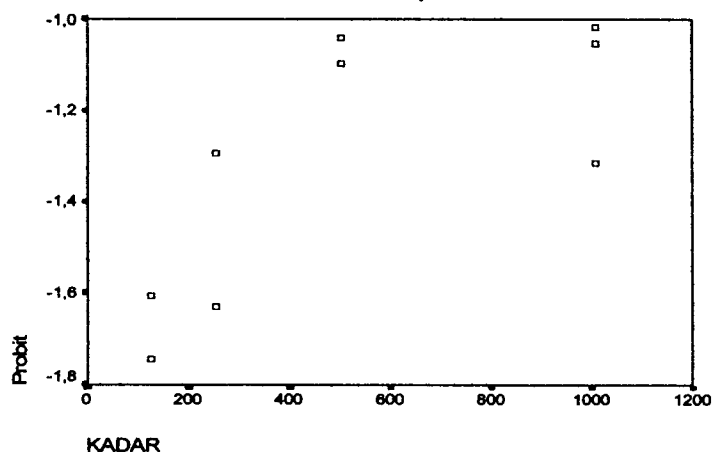
Observed and Expected Frequencies

Prob	KADAR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual
,06947	126,00	100,0	5,4	6,947	-1,535
,06947	126,00	100,0	4,1	6,947	-2,893
,07789	252,00	100,0	9,8	7,789	2,005
,07789	252,00	100,0	5,2	7,789	-2,622
,09702	504,00	100,0	13,7	9,702	3,958
,09702	504,00	100,0	14,9	9,702	5,163
,14517	1008,00	100,0	15,5	14,517	,947
,14517	1008,00	100,0	14,6	14,517	,078
,14517	1008,00	100,0	9,4	14,517	-5,094

Confidence Limits for Effective KADAR

Prob	KADAR	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	-1641,59536	-5735,19915	-745,42837
,02	-1072,41984	-4135,22913	-393,22160
,03	-711,29622	-3122,89279	-166,96435
,04	-439,63698	-2364,36123	6,24979
,05	-218,66315	-1751,10737	150,89918
,06	-30,57972	-1234,32205	279,20857
,07	134,33266	-789,06623	399,57461
,08	281,99203	-403,35272	520,30801
,09	416,28231	-75,15983	652,70832
,10	539,89674	189,11893	812,40637
,15	1051,69350	787,21034	1969,69219
,20	1458,45334	1071,87830	3080,14241
,25	1807,41706	1297,23686	4051,67101
,30	2120,79727	1494,59252	4929,15703
,35	2411,19074	1675,38245	5744,36808
,40	2686,74574	1845,83963	6519,01845
,45	2953,34840	2010,09639	7269,16418
,50	3215,72417	2171,30544	8007,86010
,55	3478,09994	2332,19401	8746,87651
,60	3744,70259	2495,42798	9498,04503
,65	4020,25759	2663,94297	10274,63758
,70	4310,65106	2841,36112	11093,22043
,75	4624,03127	3032,66882	11976,75439
,80	4972,99499	3245,55129	12960,75909
,85	5379,75483	3493,53907	14107,88949
,90	5891,55159	3805,38645	15551,41934
,91	6015,16602	3880,68303	15900,09957
,92	6149,45630	3962,47340	16278,90240
,93	6297,11567	4052,39610	16695,42661
,94	6462,02805	4152,81401	17160,63057
,95	6650,11148	4267,32738	17691,21190
,96	6871,08531	4401,84880	18314,59373
,97	7142,74455	4567,20316	19080,98508
,98	7503,86817	4786,97910	20099,80272
,99	8073,04369	5133,30731	21705,65130

Probit Transformed Responses



Lampiran 4

Foto Sel Limfosit Normal Manusia Dengan Perbesaran $1,5 \cdot 10^4 \times$

