

# TESIS

## **POTENSI IMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN JAWER KOTOK (*Plectranthus scutellaroides*) TERHADAP EKSPRESI SEL T CD4<sup>+</sup> DAN SEKRESI IFN $\gamma$**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



Oleh :

**ULVA MOHTAR LUTFI**

**NIM 061144004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2013**

**POTENSI IMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN JAWER  
KOTOK (*Plectranthus scutellaroides*) TERHADAP EKSPRESI  
SEL T CD4<sup>+</sup> DAN SEKRESI IFN $\gamma$**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk Memperoleh Gelar Magister Dalam Program Studi  
Vaksinologi Dan Imunoterapeutika Pada Program Pasca Sarjana  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

**ULVA MOHTAR LUTFI**

**NIM : 061144004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPEUTIKA  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2013**


## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

### **POTENSI IMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN JAWER KOTOK (*Plectranthus scutellaroides*) TERHADAP EKSPRESI SEL T CD4<sup>+</sup> DAN SEKRESI IFN $\gamma$**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 27 Agustus 2013

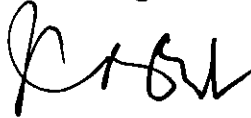
METERAI  
TEMPEL  
Pajak Pertambahan Nilai  
T.A.  
2013  
C7231ABF780468138  
ENAM RIBU RUPIAH  
6000  
DJP  
  
Ulva Mohtar Lutfi  
NIM 061144004

**Lembar Pengesahan**

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
Tanggal: 27 Agustus 2013

Oleh:

Pembimbing Ketua



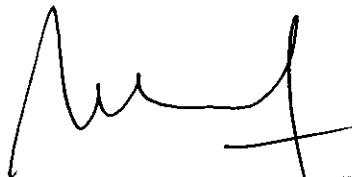
**Dr. Kusnoto, Drh., M.Si.**  
NIP 196310031992032001

Pembimbing



**Prof. Dr. Imam Mustofa, Drh., M.Kes.**  
NIP. 196004271987011001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



**Prof. Dr. H. Fedik Abdul Rantam, Drh.**  
NIP 195910031987011

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji hanya milik Allah SWT yang Maha berkehendak, atas hidayah, berkah dan karuniaNya, serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhamad SAW yang telah menuntun dengan akhlak dan ilmu pengetahuan sehingga penulis dapat menyelesaikan proses penulisan tesis yang berjudul **“Potensi Imunomodulator Ekstrak Daun Jawer Kotok (*Plectranthus Scutellaroides*) Terhadap Ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> Dan Sekresi IFN $\gamma$ ”**, sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Magister di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Proses perencanaan dan penyusunan tesis ini tidak lepas dari peran berbagai pihak. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Kusnoto, Drh., M.Si. dan Prof. Dr. Imam Mustofa, Drh., M.Kes., selaku pembimbing yang telah memberikan komitmen dan dedikasinya yang luar biasa dalam membimbing dan terutama untuk kesempatan berdiskusi yang solutif.

Terimakasih kepada Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., PhD. selaku Dekan beserta staf pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, atas kesempatan berharga untuk menimba ilmu di Institusi yang Ibu/Bapak pimpin.

Perhatian, kesabaran dan stimulasi yang persisten untuk terus mengembangkan diri dalam proses pendidikan dari Prof. Dr. H. Fedik A. Rantam, Drh. selaku Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika beserta staf pengajar, penulis mengucapkan terimakasih.

Prof. Dr. Rahayu Ernawati, Drh., MSc., Prof. Dr. H. Fedik A. Rantam, Drh. dan Dr. Rimayanti, Drh., Mkes., atas kesediaan memeriksa, menguji dan memberi masukan dalam penyempurnaan proposal dan tesis.

Helen Susilowati, SKM., Anas Prasetyo, S.Si., Deya K., Drh., Risty D., Drh., Noura, Drh., Erik H., S.Si., Yudi, Amd., Dr. Purwati, dr., M.Si., SpPD., dan Handoko dari *Institut Tropical Disease*, Bu Suci dari *Diagnostic Center RSUD Dr Soetomo*, Pak Udik SBAK FKH, Sri Gunarso S.Si., Apt., dari Unit Layanan Jasa Industri, Farmasi Unair dan Dr. Rahayu, SKM., MKes., dari Laboratorium Tuberculosis ITD atas segala bantuan dalam pelaksanaan penelitian tesis ini.

Bapak Ir. Deni Sorel, M.Si., beserta pimpinan Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh Sumatera Barat, kolega staf dan teknisi Jurusan Budidaya Tanaman Pangan dan Prodi Peternakan atas kesempatan berharga dan dukungan dalam melaksanakan tugas belajar, penulis menyampaikan terimakasih.

Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan fasilitas Beasiswa Pascasarjana Dalam Negeri (BPDN), penulis mengucapkan terimakasih.

Hormat dan terimakasih kepada Bapak Achmad Budaeri, Ibu Suparmi dan Mbah Sumini atas kasih sayang, pengorbanan dan doa dalam mendidik penulis. Papa H. Zardinal dan Mama Hj. Yustinar terimakasih atas dukungan dan doanya. Saudara-saudara Dyah Ayu C.N., S.Pd., Huda Amd., Yesy Vinely, S.Si., Zulfira, M. Yusuf H., Amd., Feni Elvita Amd.Kep., Zaki Arif, Lc., Retno S.Pd., Santi Silvina Amd.Keb., Hendri, Tomi, Amd., Sartik, S.Pd., dan Weni W., S.Psi., terimakasih.

Khusus istriku tercinta Livia Trisna, SKM., terimakasih atas kasih sayang, pengertian, doa dan spiritnya. Sahabat kecilku Faiza Khairina Falevi dan M. Quthbi Ilmany Falevi terimakasih untuk senyum dan kelucuannya.

Rekan-rekan seperjuangan di Prodi Vaksinologi dan Imunoterapetika Ibu Anieka Rohmah, Drh., Nailul Izzah, S.Pi., Andi Jaya, Drh., Rizky Arya Pradikta Drh., M.Vet., Febri Drh., M.Vet., Ahmad Brilliant, Drh., Desty, Drh., M.Vet., Berni Drh., M.Vet., Anang Drh., M.Vet., Doni, Drh., Alma Drh., Helen SKM, Noura Drh., Risti Drh., Nova Drh., Eni Drh., dan Nurrus Drh., terimakasih atas kerjasama dan kekompakkannya.

Erprabawa Yudha S.Si., M.Sc., Hendra Alfi, SP., M.Si., dan Fery M., S.Kom., Silvia, SP., Resa Yulita, SS., Veronice., SP. dan kolega di Politani Negeri Payakumbuh, Teman-teman FKH UA angkatan 97, terimakasih. Yudi K., S.Sos., Suci Kurniawan, Arif Efendi, Eko Nurcahyono, Dadang S.IP., Budiarna S.Psi., Jusuf Agung,S.Psi.,M.Psi., Rahman S.Psi., Iwan W.W., S.Psi, M.Psi., Syamsul Amd., Rista SSi., Nida, Zamzami SPsi., M.Psi., Andry, Bagus, Satya, Anggi, Renta, Slamet dan semua Keluarga Besar Sanggar Pramuka Unair terimakasih. Semua pihak baik yang secara langsung maupun tidak langsung berperan dan membantu proses penelitian dan tesis, penulis sampaikan terimakasih.

Penulis mengharapkan partisipasi semua pihak untuk memberikan kritik dan saran guna menyempurnakan tulisan ini, sehingga lebih bermanfaat.

Surabaya, Agustus 2013

Penulis



# RINGKASAN



## RINGKASAN

**“POTENSI IMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN JAWER KOTOK  
(*PLECTRANTHUS SCUTELLAROIDES*) TERHADAP EKSPRESI SEL T  
CD4<sup>+</sup> DAN SEKRESI IFN $\gamma$ ”**

Obat tradisional Indonesia merupakan warisan budaya bangsa sehingga perlu digali, diteliti dan dikembangkan agar dapat digunakan lebih luas oleh masyarakat. Tanaman yang telah banyak digunakan dalam Ethnofarmakologi adalah sumber besar dari imunomodulator, namun bioaktivitas ini membutuhkan bukti ilmiah untuk mengkonfirmasi keamanan dan dosis efektif. Memilih target sel imun dan organ kekebalan yang sesuai dan spesifik dalam penelitian imunomodulasi memberikan pemahaman tentang interaksi zat tertentu dengan sel-sel imun spesifik. Eksplorasi herbal terhadap potensi imunomodulator telah menghasilkan beberapa tanaman yang poten. Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas imunomodulator adalah daun Jawer kotok dengan kandungan flavanoid berupa kuersetin. Imunomodulasi bahan dari tanaman dapat mengaktivasi sistem imun non spesifik (fagosit dan Sel NK) dan spesifik (Sel T dan Sel B) serta produksi sitokin, sehingga dapat digunakan sebagai ajuvan penyembuhan penyakit infeksi. Berdasarkan Potensi imunomodulator dan kandungan senyawa kuersetin, perlu dilakukan penelitian dengan dosis bertingkat tentang potensi ekstrak daun Jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*) terhadap ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  secara *in vitro* setelah infeksi virus *Dengue* tipe-2.

Tujuan penelitian adalah : Membuktikan pemberian ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthrantus scutellaroides*) dosis 5 $\mu$ g dan 10 $\mu$ g memiliki potensi imunomodulator dalam meningkatkan jumlah ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC manusia yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2.

Sampel yang digunakan adalah kultur sel PBMC dari manusia sehat, berumur 20-35 tahun dengan besar sampel 30 sel kultur yang terdiri 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok 5 ulangan dalam 30 *wells*. Sebagai pembanding perlakuan ekstrak Jawer kotok dibandingkan kontrol yang tidak diberi ekstrak Jawer kotok.

Data hasil pemeriksaan *flow citometry* berupa jumlah ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> dan pemeriksaan ELISA sekresi IFN $\gamma$  setelah infeksi virus *Dengue* tipe 2 dan pemberian dosis ekstrak daun Jawer kotok kelompok kontrol dan perlakuan. Analisis data menggunakan statistik ANOVA dan untuk melihat perbedaan antar perlakuan dilakukan uji HSD 5%.

Hasil pemeriksaan *flow citometry* ekspresi CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> pada kultur PBMC yang menunjukkan ekstrak jawer kotok tidak berbeda nyata dengan kontrol dalam ekspresi CD3<sup>+</sup> sel T. Ekstrak Jawer kotok 5 $\mu$ g mampu memodulasi ekspresi CD4<sup>+</sup> sel T 47,57 $\pm$ 0,714<sup>a</sup> yang berbeda nyata dengan K (kontrol) (p<0,05) tetapi tidak berbeda nyata dengan P1, P2, P3 dan P4.

Pemeriksaan kadar IFN $\gamma$  dengan Elisa Ekstrak daun Jawer kotok dosis 10 $\mu$ g yang diinokulasikan setelah infeksi virus *Dengue* tipe-2 ITD Unair (P3), memiliki potensi imunomodulasi dalam meningkatkan sekresi IFN $\gamma$  104,00 $\pm$ 24,860<sup>a</sup> yang berbeda nyata (p<0,05) dengan K, P0, P1, P2 dan P4. Kadar IFN $\gamma$  yang lebih tinggi (P3) tidak berkaitan dengan *cytokine storm* seperti TNF $\alpha$  yang berperan dalam peningkatan patogenesis penyakit *dengue hemorrhagic fever*, tetapi potensi kandungan ekstrak tanaman yang bersifat antiviral.

**SUMMARY****IMMUNOMODULATOR POTENTIAL OF JAWER KOTOK'S  
(*PLECTRANTHUS SCUTELLAROIDES*) LEAVES EXTRACT TOWARD T  
CELL CD4<sup>+</sup> EXPRESSION AND IFN $\gamma$  SECRETION**

Indonesian traditional medicine is the nation's cultural heritage that needs to be explored, researched and developed to be used by the wider community. Plants that have been widely used in Ethnofarmakologi is a great source of immunomodulatory, but this bioactivity requires scientific evidence to confirm the safety and effective dose. Selecting targets immune cells and immune organ appropriate and specific immunomodulating research provides an understanding of the interaction of certain substances with specific immune cells. Exploration of the potential immunomodulatory herbs have result some potent plants. One of the plants that have immunomodulatory activity of leaves Jawer kotok with flavonoids such as quercetin content. Immunomodulating ingredients of the plant to activate the non-specific immune system (phagocytes and NK cells) and specific (T cells and B cells) as well as the production of cytokines, which can be used as an adjuvant cure infectious diseases. Based on the potential immunomodulatory and content of the compound quercetin, research needs to be done with the rise of the potential dose Jawer kotok leaf extract (*Plectranthus scutellaroides*) on the expression of CD4 + T cells and IFN secretion in vitro after infection with dengue virus type-2.

Objectives of the research are : Proving that the delivery of Jawer Kotok's leaves extract has immunomodulatory activities which are increasing the amount of T cell CD4<sup>+</sup> expression and secretion of IFN $\gamma$  in the cultured human PBMC infected with type 2 Dengue virus.

The sample used were cultured human PBMC from healthy man who has aged 20-35 years old, with a total sampel of 30 cultures comprised of 6 treatment group, and each group reiterates 5 times in 30 wells. And as for the comparison, the Jawer Kotok's extract treatment compared to controls which were not given the Jawer Kotok's extract.

The data coming from flow cytometry examination were the number of TCell CD4<sup>+</sup> expression and ELISA examination of IFN $\gamma$  secretion after being infected with type-2 Dengue virus and Jawer Kotok's leaves extract dosing toward control and treatment group. The ANOVA was used for the data analysis while HSD test 5% was used to see the difference between treatments.

The result of flow cytometry examination of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> expression on PBMC cultures which showed the Jawer Kotok not significantly different from controls in the expression of T-cell CD3<sup>+</sup>. 5  $\mu$ g extract of Jawer Kotok able to modulate the T cell CD4<sup>+</sup> expression  $47.57 \pm 0.741^a$  which is significantly different from K (control) ( $p < 0.05$ ), but not significantly different from P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> and P<sub>4</sub>.

The examination of IFN $\gamma$  level using ELISA of Jawer Kotok leaves extract 10 $\mu$ g doses which were inoculated after being infected with type-2 Dengue virus of Airlangga University Tropical Disease Institute has immunomodulating potential in increasing the secretion of IFN $\gamma$   $104.00 \pm 24.860^a$  which is significantly different ( $p < 0.05$ ) with K, P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>4</sub>. Higher levels of IFN $\gamma$  in P<sub>3</sub> is not associated with cytokine storm, such as TNF $\alpha$  which plays a role in increasing Dengue Hemorrhagic Fever disease pathogenesis, but it is a potential content of plant extracts which are antiviral.

**POTENSI IMUNOMODULATOR EKSTRAK DAUN JAWER KOTOK  
(*PLECTRANTHUS SCUTELLAROIDES*) TERHADAP EKSPRESI SEL T  
CD4<sup>+</sup> DAN SEKRESI IFN $\gamma$**

Ulva mohtar lutfi

**ABSTRAK**

Eksplorasi herbal terhadap potensi imunomodulator telah menghasilkan beberapa tanaman yang poten. Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas imunomodulator adalah daun Jawer kotok dengan kandungan flavanoid berupa kuersetin. Imunomodulasi bahan dari tanaman dapat mengaktivasi sistem imun non spesifik (fagosit dan Sel NK) dan spesifik (Sel T dan Sel B) serta produksi sitokin, sehingga dapat digunakan sebagai ajuvan penyembuhan penyakit infeksi. Tujuan penelitian adalah : Membuktikan pemberian ekstrak daun Jawer kotok memiliki potensi imunomodulasi meningkatkan jumlah ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC manusia yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2. Hasil pemeriksaan *flow cytometry* ekspresi CD3<sup>+</sup> pada kultur PBMC menunjukkan bahwa ekstrak jawer kotok tidak berbeda nyata dengan kontrol dalam ekspresi CD3<sup>+</sup> sel T. Ekstrak Jawer kotok 5 $\mu$ g mampu memodulasi ekspresi CD4<sup>+</sup> sel T 47,57 $\pm$ 0,714<sup>a</sup> yang berbeda nyata dengan K (kontrol) (p<0,05) tetapi tidak berbeda nyata dengan P1, P2, P3 dan P4. Pemeriksaan kadar IFN $\gamma$  dengan Elisa Ekstrak daun Jawer kotok dosis 10 $\mu$ g yang diinokulasikan setelah infeksi virus *Dengue* tipe-2 ITD Unair(P3), memiliki potensi imunomodulasi dalam meningkatkan sekresi IFN $\gamma$  104,00 $\pm$ 24,86<sup>a</sup> yang berbeda nyata (p<0,05) dengan K, P0, P1, P2 dan P4. Kadar IFN $\gamma$  yang lebih tinggi (P3) tidak berkaitan dengan *cytokine storm* seperti TNF $\alpha$  yang berperan dalam peningkatan patogenesis penyakit *dengue hemorrhagic fever*, tetapi potensi kandungan ekstrak tanaman yang bersifat antiviral.

**Keywords :** *Plecthrantus scutellaroides*, imunomodulator, *Dengue Virus type-2*, CD4<sup>+</sup>, IFN $\gamma$

**IMMUNOMODULATOR POTENTIAL OF JAWER KOTOK'S  
(*PLECTRANTHUS SCUTELLAROIDES*) LEAVES EXTRACT TOWARD T  
CELL CD4<sup>+</sup> EXPRESSION AND IFN $\gamma$  SECRETION**

Ulva mohtar lutfi

**ABSTRACT**

Exploration of the potential immunomodulatory herbs have result some potent plants. One of the plants that have immunomodulatory activity of leaves Jawer kotok with flavonoids such as quercetin content. Immunomodulating ingredients of the plant to activate the non-specific immune system (phagocytes and NK cells) and specific (T cells and B cells) as well as the production of cytokines, which can be used as an adjuvant cure infectious diseases. Objectives of the research are : Proving that the delivery of Jawer Kotok's leaves extract has immunomodulatory activities which are increasing the amount of T cell CD4<sup>+</sup> expression and secretion of IFN $\gamma$  in the cultured human PBMC infected with type 2 *Dengue* virus. The result of *flow citometry* examination of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> expression on PBMC cultures which showed the Jawer Kotok not significantly different from controls in the expression of T-cell CD3<sup>+</sup>. 5  $\mu$ g extract of Jawer Kotok able to modulate the T cell CD4<sup>+</sup> expression  $47.57 \pm 0.741^a$  which is significantly different from K (control) ( $p < 0.05$ ), but not significantly different from P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> and P<sub>4</sub>. The examination of IFN $\gamma$  level using ELISA of Jawer Kotok leaves extract 10 $\mu$ g doses which were inoculated after being infected with type-2 *Dengue* virus of Airlangga University Tropical Disesase Institute has immunomodulating potential in increasing the secretion of IFN $\gamma$   $104.00 \pm 24.86^a$  which is significantly different ( $p < 0.05$ ) with K, P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>4</sub>. Higher levels of IFN $\gamma$  in P<sub>3</sub> (PBMC cultures infected with virus) is not associated with *cytokine storm*, such as TNF $\alpha$  which plays a role in increasing *Dengue Hemorrhagic Fever* disease pathogenesis, but it is a potential content of plant extracts which are antiviral.

**Keywords :** *Plecthrantus scutellaroides*, immunomodulator, *Dengue Virus type-2*, CD4<sup>+</sup>



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN.....	iv
LEMBAR PENGESAHAN.....	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN.....	x
SUMMARY.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
DAFTAR ISI .....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xxi
<b>BAB 1. Pendahuluan. ....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian ....	5
<b>BAB 2. Tinjauan Pustaka .....</b>	<b>6</b>
2.1 Tanaman Jawer kotok ( <i>Plecthrantus scutellaroides</i> ).....	6
2.1.1 Morfologi Tanaman.....	6
2.1.2 Taksonomi Tanaman.....	7
2.1.2 Manfaat Tanaman.....	8
2.1.4 Kandungan Kimia.....	9
2.2 Imunomodulator.....	9
2.3 Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	13
2.4 Interferon Gama(IFN $\gamma$ ).....	18
2.5 <i>Pheriperal Blood Mononuclear Cells</i> (PBMC).....	22
2.6 Virus <i>Dengue</i> tipe 2.....	23

BAB 3. Kerangka Konseptual dan Hipotesis .....	25
3.1 Kerangka Konseptual penelitian.....	25
3.2 Hipotesis.....	29
BAB 4. MATERI DAN METODE.....	30
4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	30
4.2 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	30
4.3 Variabel Penelitian.....	30
4.3.1 Variabel bebas .....	30
4.3.2 Variabel tergantung .....	30
4.3.3 Variabel Kendali .....	31
4.3.4 Definisi Operasional .....	31
4.4 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	32
4.5 Bahan Penelitian.....	32
4.6 Instrumen Penelitian.....	33
4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data.....	33
4.7.1 Teknik Sampling dan Kelompok Perlakuan.....	33
4.7.2 Prosedur Identifikasi dan Ekstraksi Daun Jawer kotok.....	33
4.7.3 Prosedur Pembuatan Kultur sel PBMC.....	34
4.7.4 Prosedur Pemberian Ekstrak Daun Jawer kotok.....	35
4.7.5 Prosedur Infeksi Virus <i>Dengue</i> Tipe 2.....	36
4.7.6 Prosedur <i>Flow Cytometry</i> Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	36
4.7.7 Prosedur Pemeriksaan ELISA IFN $\gamma$ .....	37
4.8 Kerangka Operasional.....	39
4.9 Analisis Data .....	39
BAB 5 HASIL.....	40
5.1 Ekspresi Sel T CD3 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> .....	40
5.2 Kadar Sekresi Interferon Gama (IFN $\gamma$ ).....	43
BAB 6 PEMBAHASAN.....	45
6.1 Potensi Imunomodulasi Ekstrak Jawer Kotok ( <i>Plecthranthus scutellaroides</i> ) Terhadap Ekspresi Sel T CD3 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> .....	45
6.2 Potensi Imunomodulasi Ekstrak Jawer Kotok ( <i>Plecthranthus scutellaroides</i> ) Terhadap Sekresi IFN $\gamma$ .....	49
6.3 Potensi Immunostimulator Ekstrak Jawer Kotok ( <i>Plecthranthus scutellaroides</i> ) Terhadap Ekspresi Sel T CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> dan Sekresi IFN $\gamma$ .....	51
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN .....	54
7.1 Kesimpulan .....	54
7.2 Saran .....	54
DAFTAR PUSTAKA .....	55
LAMPIRAN .....	64

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Jawer Kotok.....	6
2.2 Diferensiasi Sel T CD4.....	16
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	29
4.1 Kerangka Operasional.....	39
5.1 Kultur Sel PBMC Hari Pertama (inkubasi 24 jam, sebelum infeksi)....	41
5.2 Kultur Sel PBMC Hari Ketiga (48 jam pasca infeksi dan inokulasi ekstrak).....	41
5.3 Ekspresi sel T CD3 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> setelah 48 jam inkubasi pasca infeksi.....	43
5.4 Grafik Ekspresi Rata-Rata Sel T CD4 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> dan Kadar IFN $\gamma$ .....	44

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Data potensi ekstrak jawer kotok terhadap ekspresi CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$ .....	42

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Identifikasi Tanaman Jawer kotok.....	65
2. Kultur Sel PBMC perbesaran 400 x.....	66
3. Hasil Pemeriksaan <i>Flow Citometry</i> Sel T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> .....	68
4. Nilai optimum density (OD) dan kadar IFN $\gamma$ hasil pemeriksaan ELISA.....	71
5. Analisa Statistik CD4 <sup>+</sup> ,CD3 <sup>+</sup> dan IFN $\gamma$ .....	72

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ADE	: <i>Antibody Dependent Enhancement</i>
AIDS	: <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
C5a	: <i>Complement 5a</i>
C3a	: <i>Complement 3a</i>
CD4 <sup>+</sup>	: <i>Cluster Differentiation 4<sup>+</sup></i>
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
ChIFN $\gamma$	: <i>Chickens Interferon gama</i>
CTLs	: <i>Citolytic T Limfosite</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
Den V-2	: <i>Dengue Virus type-2</i>
EDTA	: <i>Ethylendiamin tetra acetic acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	: <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte Stimulating Factor</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSD	: <i>Honestly Significant Difference</i>
HRP	: <i>Horse Radish Peroxidase</i>
IFN $\gamma$	: <i>Interferon gama</i>
IL-2	: <i>Interleukin 2</i>
IL-4	: <i>Interleukin 4</i>
IL-5	: <i>Interleukin 5</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
IL12	: <i>Interleukin 12</i>
IU	: <i>International Unit</i>
kD	: <i>kilo Dalton</i>
MEM	: <i>Minimum Essential Medium</i>



MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
µg	: <i>Micro gram</i>
µl	: <i>Micro liter</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
nm	: <i>Nano Meter</i>
NS1	: <i>Non Structural 1</i>
NS2α	: <i>Non Structural 2 Alfa</i>
OD	: <i>Optimum Density</i>
PAF	: <i>Platellet Activation Factor</i>
PBMC	: <i>Pheriperal Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	: <i>Phospat Buffer Saline</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SARS	: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
Th1	: <i>T helper 1</i>
Th2	: <i>T helper 2</i>
TMB	: <i>Tetramethylbenzidine</i>
TNFα	: <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
xg	: <i>Times Gravity</i>
°C	: <i>Derajat Celcius</i>

## **BAB 1**

# PENDAHULUAN

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Masyarakat Indonesia, memanfaatkan jamu atau obat tradisional selama beberapa generasi untuk pengobatan. Khasiat secara empiris yang telah dirasakan membuat kepercayaan masyarakat pada obat tradisional yang sebagian besar dari bahan herbal meningkat signifikan. Kendala pemanfaatan obat tradisional secara lebih luas adalah bukti ilmiah tentang khasiat obat tradisional yang masih belum memadai. Obat tradisional Indonesia merupakan warisan budaya bangsa sehingga perlu digali, diteliti dan dikembangkan agar dapat digunakan lebih luas oleh masyarakat (Dewoto, 2007). Salah satu mekanisme utama obat tradisional adalah mempengaruhi sistem imun tubuh, tetapi aktivitas tanaman obat sebagai imunostimulan pada literatur obat tradisional dan etnofarmakologi sangat sulit ditemukan (Wagner *and* Wiesenauer, 1995; Wagner, 1999).

Senyawa tertentu yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik dan terjadi induksi non spesifik baik mekanisme pertahanan seluler maupun humoral disebut imunomodulator. Pengaruh imunomodulator digolongkan sebagai imunostimulan, immunosupresan dan immunorestorasi. Sifat bahan imunomodulator memiliki antigenitas sedikit sekali, bahkan sebagian bekerja sebagai mitogen yaitu meningkatkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas (Widianto, 1987). Khasiat imunomodulator menggunakan sitokin rekombinan sudah banyak diteliti dan beberapa hasilnya membuktikan potensi sitokin rekombinan interferon gama ( $IFN\gamma$ ) yang

dikombinasikan dengan vaksin. Penambahan IFN $\gamma$  pada vaksin malaria telah dicoba pada mencit yang bersifat imunokompromais sebagai ajuvan (Heath *et al.*, 1989). Selain itu apabila IFN $\gamma$  diberikan bersama vaksin subunit *vesicular stomatitis virus* (Anderson *et al.*, 1989) dan vaksin influenza (Cao *et al.*, 1992) menaikkan titer antibodi, sehingga dapat mencegah terjadinya penyakit yang disebabkan oleh virus tersebut. Vaksin yang diberikan bersama IFN $\gamma$  dapat meningkatkan aktivitas sel T sehingga menginduksi imunitas humoral (Lawman *et al.*, 1990). Pemberian *chicken interferon- $\gamma$*  (ChIFN $\gamma$ ) pada ayam umur 1 hari meningkatkan daya proteksi pada saat ujiantang (*challenge*) dengan virus *Newcastle Disease* (ND) strain La Sota (Marcus *et al.*, 1999). Beberapa faktor dapat menghambat penggunaan sitokin rekombinan, karena molekul sitokin bersifat tidak stabil dan mudah mengalami degradasi. Pemberian sitokin sering menyebabkan efek negatif seperti terjadinya *neutrophilia* atau defektif fungsi neutrofil, *lymphopenias* dan *monocytopenia* (Lowenthal *et al.*, 2000).

Alternatif imunomodulasi sitokin dengan efek negatif minimal, ekonomis, praktis dan efikasi terukur diperlukan. Modulasi sekresi sitokin menawarkan pendekatan baru dalam pengobatan berbagai penyakit. Salah satu strategi dalam modulasi sekresi sitokin melalui penggunaan obat-obatan herbal (Spellman *et al.*, 2006). Tanaman yang telah banyak digunakan dalam Ethnofarmakologi adalah sumber besar dari imunomodulator, namun bioaktivitas ini membutuhkan bukti ilmiah untuk mengkonfirmasi keamanan dan dosis efektif. Memilih target sel imun dan organ kekebalan yang sesuai dan spesifik dalam penelitian imunomodulasi memberikan pemahaman tentang interaksi zat tertentu dengan sel-

sel imun spesifik (Yeap *et al.*, 2011). Berbagai bahan asal tanaman dapat memacu fungsi berbagai komponen sistem imun nonspesifik (fagosit, sel NK) dan sistem imun spesifik (proliferasi sel T, sel B yang memproduksi antibodi) serta produksi sitokin sehingga dapat digunakan dalam klinik sebagai adjuvan untuk meningkatkan penyembuhan berbagai penyakit infeksi (Baratawidjaya, 2006; Anderson, 1999).

Mutasi berbagai virus yang terjadi oleh karena pengobatan antiviral yang lama, akan memicu terus terjadinya kemungkinan resistensi virus terhadap satu atau lebih obat antiviral. Sehubungan hal-hal tersebut di atas, maka perlu terus dilakukan berbagai penelitian untuk mengembangkan berbagai obat anti viral baru yang lebih efektif dengan efek toksik yang lebih ringan, termasuk penelitian mengenai efek imunomodulator (Djayakusumah, 2010). Pendekatan penelitian imunomodulator herbal, dapat dilakukan dari berbagai aspek seperti etnobotani, etnofarmasi, etnofarmakologi dan etnomedis dilanjutkan dengan uji secara *in vitro* dengan mengukur produk imun seperti antibodi, interleukin dan interferon (Suhirman dan Winarti, 2007 ; Iwo, 2006).

Eksplorasi herbal dari 32 spesies tanaman dari Alas Purwo, Banyuwangi tentang aktivitas imunomodulasi, menghasilkan tujuh spesies tanaman memiliki aktivitas imunomodulator. Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas imunomodulator adalah daun Jawer kotok, yang telah diketahui sebagai bahan obat etnofarmasi yang berpotensi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan antikanker. Berdasarkan penelitian farmakologi model eksperimental, diketahui bahwa jawer kotok mengandung flavonoid yang dapat bertindak sebagai

anti-inflamasi, anti-hipertensi dan anti kanker (Lutfi dkk., 2012; Moelyono, 2006). Hasil analisis *Hight Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang dilakukan Moektiwardoyo dkk. (2011) memperjelas kandungan flavonol adalah kuersetin dengan kadar 0,05% pada ekstrak methanol daun Jawer kotok. Hasil eksperimen secara *in vitro* dari favonoid golongan flavones dan flavonols telah menunjukkan adanya respon imun (Hollman *et al.*, 1996).

Penelitian pendahuluan telah dilakukan tentang potensi imunomodulator infusa daun Jawer Kotok pada *Pheriperal Blood Mononuclear Cells* (PBMC) *in vitro*, menunjukkan aktivitas imunomodulasi dalam meningkatkan ekspresi IFN $\gamma$  dan Sel T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> serta tidak menimbulkan kerusakan kultur sel (Lutfi dkk., 2012). Berdasarkan Potensi imunomodulator dan kandungan senyawa kuersetin, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan dosis bertingkat tentang potensi ekstrak daun Jawer Kotok (*Plectranthus scutellaroides*) terhadap ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  secara *in vitro* setelah infeksi virus *Dengue* tipe-2.

## 1.2 Rumusan Permasalahan

Permasalahan yang dibahas dalam peneltian ini, adalah : Apakah pemberian ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthrantus scutellaroides*) dosis 5 $\mu$ g dan 10 $\mu$ g memiliki potensi imunomodulator dalam meningkatkan jumlah ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC manusia yang diinfeksi virus *Dengue* tipe-2?



### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah : Membuktikan pemberian ekstrak daun Jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*) dosis 5 $\mu$ g dan 10 $\mu$ g memiliki potensi imunomodulator dalam meningkatkan jumlah ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC manusia yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.3.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam :

- 1) Memberikan informasi tentang potensi ekstrak Daun Jawer Kotok (*Plectranthus scutellaroides*) sebagai imunomodulator dalam menstimulasi ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  pasca infeksi virus *Dengue* tipe-2.
- 2) Penentuan dosis penggunaan Daun Jawer Kotok (*Plectranthus scutellaroides*) sebagai imunomodulator secara *in vitro*.

#### 1.3.2 Manfaat Praktis

Dasar penelitian *in vivo* dalam penentuan dosis untuk menemukan alternatif imunomodulasi aktivasi imun seluler dan sitokin herbal.

## **BAB 2**

# TINJAUAN PUSTAKA

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Jawer Kotok (*Plectranthus scutellarioides*)

#### 2.1.1 Morfologi Tanaman Jawer Kotok

Tumbuhan Jawer kotok tumbuh secara liar diladang atau dikebun-kebun dan bisa digunakan sebagai tanaman hias. Tumbuhan Jawer kotok tumbuh subur di daerah dataran rendah sampai ketinggian 1500 meter diatas permukaan laut dan merupakan tanaman semusim. Umumnya tumbuhan ini ditemukan di tempat lembab dan terbuka seperti pematang sawah, tepi jalan pedesaan di kebun-kebun sebagai tanaman liar atau tanaman obat (Yuniarti, 2008). Tanaman pada Gambar 2.1 telah diidentifikasi sebagai tanaman Jawer kotok (*Plectranthus scutellarioides*) (Hamidah, 2013).



**Gambar 2.1** Tanaman Jawer Kotok (ditunjukkan tanda panah).

Berbatang basah yang tingginya bisa mencapai satu meter. Daunnya berbentuk segitiga atau bentuk bulat telur dengan warna yang sangat bervariasi dari hijau hingga merah ungu berbulu, dan tepinya bergerigi. Bunganya berwarna merah atau putih, ungu atau kuning. Tumbuh liar di ladang-ladang dan di kebun-kebun. Tanaman aromatik ini tumbuh sebagai tanaman hias di kawasan Asia-Pasifik. Batang yang berbentuk segi empat. Daun sederhana, 2,5 - 7,5 cm × 5 cm. Tangkai daun panjangnya sampai dengan 7,5 cm. Daun terdiri berbagai warna sesuai dengan varietas (Gambar 2.1). Budidaya tanaman Dapat diperbanyak dengan cara setek batang dan biji (Wiar, 2006).

### 2.1.2 Taksonomi Tanaman Jawer Kotok

Taksonomi Jawer kotok menurut Hutapea dan Syamsuhidayat (1991) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Solanales
Famili	: Lamiaceae
Genus	: <i>Plectranthus</i>
Spesies	: <i>Plectranthus scutellarioides</i> (L.)

Tanaman ini memiliki sinonim : *Coleus atropurpureus* Benth., *Coleus blumei* Benth., *Plectranthus scutellarioides*(L), *Solenostemon scutellarioides*, *Coleus blumei* var. *verschaffeltii*, *Ocimum scutellarioides* L. ( Judd *et al.*, 1999; Simpson M G, 2006; Wiar, 2006).

Tanaman Jawer kotok tersebar diberbagai provinsi di Indonesia dengan nama daerah yang berbeda-beda. Di daerah Sumatera, dikenal dengan Si gresing (Batak), Adang-adang, Adong-adong (Palembang), Miana, Pilado (Sumatera Barat), Bayam Biludu, Celala, Handa Ulu, dan Bunga Tali. Di daerah Jawa, dikenal dengan Jawer Kotok, Janggar Rumpuk, Jengger Ayam, Bayem Cenggen (Sunda), Iler (Jawa Tengah), Kentangan (Jawa Timur), Dhi-kamandhinan, Rebha Mangsor (Madura). Di Nusa Tenggara disebut Janggar Siap, Ndae Ana Sina (Bali), Bunak Manu Larit (Timor). Di daerah Sulawesi, dikenal dengan sebutan Mayam, Mayana (Manado), Ati-ati, Panci-panci, Saru-saru, Puwa Rasiwalo (Bugis), Serewung (Minahasa), Loyo, Lava, Lenggano (Sulawesi Utara), Ranang Jangan (Gorontalo), Bunga Lali Manu (Makassar), Tatana Manuk, Sampiri Manu, Bunga Api-api, dan Wunga Api-api (Hutapea dan Syamsuhidayat, 1991).

### **2.1.3 Manfaat Tanaman Jawer Kotok**

Pemanfaatan tanaman Jawer kotok oleh masyarakat Indonesia, antara lain: rebusan daun digunakan untuk menyembuhkan wasir, memperlancar menstruasi, membersihkan darah setelah melahirkan dan mengobati radang pada mata. Penduduk Malaysia menggunakan rebusan atau jus dari daun diminum untuk mengobati perut kembung, untuk mengobati penyakit hati, jantung, cacar, bengkak dan untuk menginduksi muntah. Pasta dari daun digunakan penduduk Filipina untuk meredakan sakit kepala dan menghilangkan memar (Wiar, 2006).

Jawer kotok adalah salah satu tanaman yang digunakan untuk pengobatan sakit telinga, cacingan, wasir, luka-luka kecil, sebagai pencuci mata,

mematangkan bisul dan perawatan setelah haid serta pemeliharaan pusar bayi (Suwarjiheryana, 1987). Masyarakat Sulawesi Utara memanfaatkan untuk obat wasir, bisul, terlambat haid dan kencing manis (Kinho dkk., 2011). Ramuan daun Jawer Kotok dicampur dengan buah sirih, madu dan kuning telur telah dipraktekkan sebagai obat antimalaria (Nugroho, 2011).

#### 2.1.4 Kandungan Kimia

Hasil penelitian Suwarjiheryana (1987), diperoleh informasi bahwa kadar air dalam daun Jawer kotok segar adalah sekitar 83,05% dan kadar minyak atsiri dalam serbuk daun Jawer kotok sekitar 0,047%. Senyawa kimia yang teramati adalah alkaloida, flavonoida, saponin dan minyak atsiri. Jawer kotok tanaman obat (*Plectranthus scutellaroides*) dapat digunakan sebagai obat anti inflamasi, dapat diketahui berdasarkan penelitian farmakologi model eksperimental. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, diketahui bahwa jawer kotok mengandung flavonoid yang dapat bertindak sebagai anti-inflamasi, anti hipertensi, anti kanker juga (Moelyono, 2006). Penelitian kandungan senyawa kimia dari ekstrak methanol 70% daun *Plectranthus scutellaroides* dengan HPLC mengandung 0,05 kuersetin (Muktiwardoyo dkk., 2011).

## 2.2 Imunomodulator

Kekebalan berasal dari kata Latin *immunitas*, yang berarti perlindungan. Kekebalan berarti perlindungan dari penyakit dan lebih khusus dari penyakit menular. Sel-sel dan molekul yang bertanggung jawab dalam kekebalan merupakan sistem kekebalan tubuh (*immune system*) dan respon kolektif yang



berkoordinasi terhadap pengenalan zat-zat asing disebut respon imun (*Immune response*). Mekanisme yang melindungi individu dari infeksi dan menghilangkan zat asing dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan penyakit dalam beberapa situasi. Definisi yang lebih inklusif sistem imun adalah reaksi terhadap zat asing, termasuk mikroba, serta makromolekul seperti protein dan polisakarida, terlepas dari konsekuensi fisiologis atau patologis. Immunologi adalah studi kekebalan dalam arti luas, baik dari sisi seluler dan molekuler dalam peristiwa yang terjadi setelah organisme bersinggungan dengan mikroba dan makromolekul asing lainnya (Abbas *and* Litchman, 2006).

Imunologi, dalam bentuk modern, adalah ilmu eksperimental, penjelasan fenomena imunologi didasarkan pada pengamatan dan kesimpulan yang diambil dari eksperimental. Evolusi imunologi sebagai disiplin eksperimental dipengaruhi oleh kemampuan untuk memanipulasi fungsi sistem kekebalan tubuh di bawah kondisi terkontrol. Sistem imun dapat dimanipulasi secara khusus dengan vaksinasi atau non-spesifik oleh imunomodulasi. Pengubah respon biologis atau Immunomodulator mencakup imunostimulan dan agen immunosupresif ( Abbas *and* Litchman, 2006 ; Masihi *and* Schaeferh, 2011).

Imunomodulator adalah substansi atau obat yang dapat memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun. Immunomodulator dibagi menjadi tiga kelompok: i) imunostimulator, berfungsi untuk meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun, ii) immunoregulator, artinya dapat meregulasi sistem imun, dan iii) immunosupresor yang dapat menghambat atau menekan aktivitas sistem imun. Berbeda dengan vaksin, sebagian besar agen immunomodulator tidak nyata antigen tetapi

*antigenomimetics* atau disebut mitogen. Mekanisme kerja imunomodulator dengan induksi non spesifik baik mekanisme pertahanan seluler maupun humoral. Pertahanan non spesifik terhadap antigen ini disebut paramunitas, dan zat bersangkutan disebut penginduksi paraimunitas. Induktor ini biasanya tidak atau sedikit sekali kerja antigennya, bahkan sebagian bekerja sebagai mitogen yaitu menaikkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas. Sel tujuan adalah makrofag, granulosit, limfosit T dan B; karena induktor paramunitas ini terutama menstimulasi mekanisme pertahanan seluler. Mitogen ini dapat bekerja langsung maupun tak langsung (misalnya melalui sistem komplemen atau limfosit, melalui produksi interferon atau enzim lisosomal) untuk meningkatkan fagositosis mikro dan makro. Peranannya sebagai senyawa non spesifik dan nonantigen, tidak merangsang pengembangan limfosit memori. Pengaruh imunomodulator terhadap sistem kekebalan tubuh spesifik akan berkurang secara singkat setelah jangka waktu tertentu (Wiedosari, 2007; Wagner, 1999; Mathilda, 1987).

Imunomodulator bekerja dengan augmentasi antiinfeksi imun oleh sel-sel dari sistem imun meliputi subset limfosit, makrofag, dendritik dan sel-sel *natural killer* (NK). Mekanisme lebih lanjut dapat melibatkan induksi atau pemulihan fungsi efektor kekebalan tubuh dan mengarahkan keseimbangan menuju jalur sitokin yang erat kaitannya dengan proteksi. Beragam rekombinan, sediaan imunomodulator sintesis, dan alami untuk profilaksis dan pengobatan berbagai infeksi juga tersedia saat ini (Djayakusumah, 2010; Masihi *and* Schaeferh, 2011).

Penggunaan Immunomodulator dalam praktek klinis untuk merangsang dan menormalkan aktivitas sistem kekebalan tubuh. Praktek penerapan

imunomodulator dalam metode pengobatan modern adalah untuk koreksi imunodefisiensi. Sebagian besar agen imunomodulator memainkan peran dalam mempertahankan sistem kekebalan tubuh dengan meningkatkan aktivitas sel T, mengurangi atau memblokir aktivitas supresor, merangsang sel-sel *Natural Killer* (NK sel) dan produksi interferon serta menginduksi produksi sitokin spesifik oleh sel target yang diaktifkan (Gabiuss, 2003; Stanilove *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2010).

Sediaan imunomodulator banyak yang telah mempunyai lisensi untuk dipakai sebagai pengobatan, seperti *granulocyte stimulating factor* (G-CSF), interferon, imikwimod dan fraksi membran sel dari bakteri. Sebagian lagi masih dalam proses penelitian yang ekstensif baik penelitian yang bersifat klinik maupun preklinik, seperti berbagai jenis kemokin, *cytosine phosphate-guanosine* (CpG) sintetik, *oligodeoxynucleotides* dan *glucan*. Pemberian sediaan imunomodulator merupakan pendekatan terapi yang atraktif, oleh karena efek sampingnya yang sering lebih ringan dibandingkan dengan efek samping obat-obatan yang telah ada, disamping itu lebih jarang menimbulkan resistensi pada pengobatan penyakit infeksi (Djayakusumah, 2010).

Banyak obat-obatan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan yang dikenal sebagai obat tradisional, ternyata secara klinis tidak hanya mempunyai efek langsung yang bersifat anti infeksi, namun ternyata dapat pula meningkatkan mekanisme pertahanan alamiah maupun adaptif (Djayakusumah, 2010). Menurut Ganju *et al.* (2003), imunomodulasi menggunakan tanaman obat dapat memberikan alternatif untuk kemoterapi konvensional untuk berbagai penyakit terutama ketika Mekanisme pertahanan *host* harus diaktifkan di bawah kondisi

gangguan respon imun atau ketika immunosupresi selektif yang diinginkan dalam situasi seperti gangguan autoimun. Sifat imuno korektif Immunomodulator juga bisa berhasil diterapkan dalam pengobatan penyakit onkologi. Penggunaan obat imunstimulan tidak akan menimbulkan sistem fungsi imun berlebihan karena bila fungsi imun telah normal, maka obat ini tidak lagi bekerja meningkatkan kekebalan tubuh (Karnen dkk., 2003).

Potensi imunomodulator *acemanan* yang terkandung dalam tanaman *Aloe vera* memiliki aktivitas utama dalam meningkatkan maturasi sel limfosit T-*helper* CD4<sup>+</sup> menjadi sel Th1 dan imunitas non-spesifik dengan meningkatkan sintesis sitokin, dengan demikian fungsi ekstrak *Aloe vera* dapat dipakai untuk mengatasi penyakit yang disebabkan oleh agen infeksius (bakteri dan virus) yang bersifat intraseluler (Wiedosari, 2007). Lutfi dkk. (2012), melaporkan infusa daun Jawer kotok (*Plectranthus scutellarioides*) dapat meningkatkan ekspresi IFN $\gamma$  dan meningkatkan ekspresi sel T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> secara *in vitro*.

### 2.3 Sel T CD4<sup>+</sup> (*Cluster Differentiation 4*<sup>+</sup>)

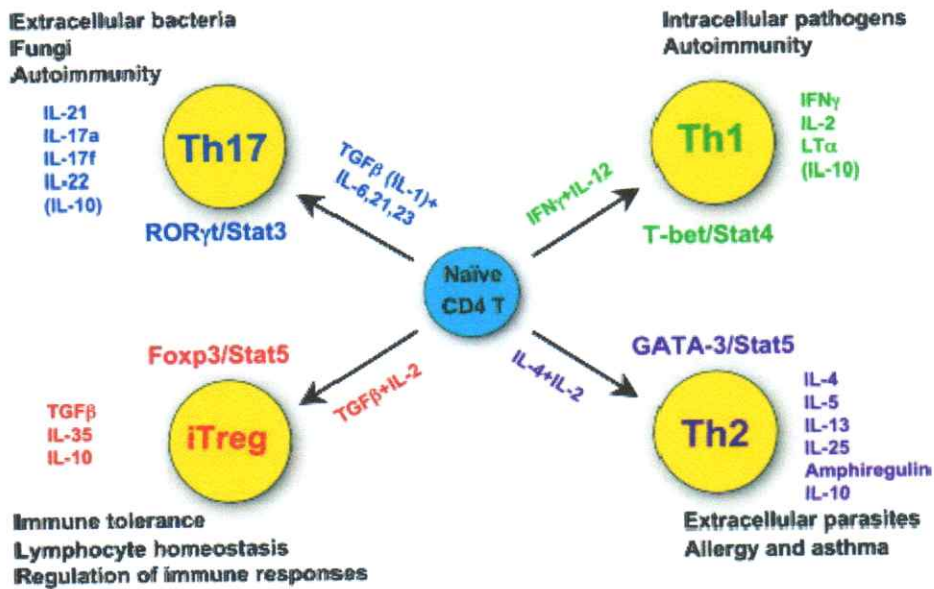
Respon imun adaptif dibagi dua yaitu, imunitas humoral (*humoral immunity*) dan imunitas diperantarai sel (*mediated cell immunity*), yang dimediasi oleh komponen yang berbeda dari sistem kekebalan tubuh dan fungsinya dalam menghilangkan berbagai jenis mikroba. Kekebalan humoral dimediasi oleh molekul di dalam cairan darah dan mukosa, yang disebut antibodi, yang diproduksi oleh sel yang disebut limfosit B (disebut juga sel B). Imunitas diperantarai sel (*mediated cell immunity*), juga disebut imunitas seluler, dimediasi oleh limfosit T (disebut juga sel T). Mikroba intraseluler, seperti virus dan

beberapa bakteri, bertahan hidup dan berkembang biak dalam fagosit dan sel inang lainnya, di mana mereka tidak dapat dijangkau peredaran antibodi. Pertahanan melawan infeksi adalah fungsi imunitas yang diperantarai sel, yang mempromosikan penghancuran mikroba yang berada difagosit atau membunuh sel yang terinfeksi untuk menghilangkan reservoir infeksi (Abbas *and* Lichman, 2006).

Limfosit memiliki keterbatasan spesifisitas untuk antigen, hanya mengenali peptida antigen yang melekat pada protein inang yang dikodekan oleh gen dalam *major histocompatibility complex* (MHC) dan yang diekspresikan pada permukaan dari sel-sel lain. Akibatnya, sel-sel T mengenali dan menanggapi permukaan sel terkait antigen yang tidak larut (*non soluble antigen*). Limfosit memiliki beberapa subset yang memiliki perbedaan fungsi dan jenis protein yang diproduksi, namun morfologinya sulit dibedakan. Sel limfosit T merupakan limfosit dominan karena berjumlah sekitar 75% dari total limfosit yang mempunyai fungsi regulasi memori dan sitotoksik. Sisanya 25% terdiri dari limfosit B dan Sel NK (*Natural Killer*). Limfosit T terdiri dari dua bagian, limfosit T-*helper* dan *cytolytic* T limfocyte (CTLs). Protein membran dapat digunakan sebagai fenotipik penanda untuk membedakan populasi limfosit yang berbeda secara fungsional. Sebagian besar sel T-*helper* mengekspresikan protein permukaan yang disebut CD4<sup>+</sup>, dan CTLs kebanyakan mengekspresikan protein permukaan yang berbeda disebut CD8<sup>+</sup> (Abbas *and* Lichman, 2006; Karnen dkk., 2003).

Sel T CD4<sup>+</sup> memainkan peran sentral dalam perlindungan kekebalan tubuh. Peranannya melalui kapasitas untuk membantu sel B membuat antibodi, untuk mendorong makrofag untuk mengembangkan peningkatan aktivitas mikrobisida, untuk merekrut neutrofil, eosinofil, dan basofil ke situs infeksi dan peradangan, dan melalui produksi sitokin dan kemokin, untuk mengatur respon imun yang lengkap (Zhu and Paul, 2008).

Identifikasi dari sel Th1/Th2 sebagai dua bagian yang berbeda oleh Covman dan Mosman adalah kontribusi yang luar biasa dibidang imunologi, hal ini memungkinkan pemahaman tentang bagaimana sel T CD4<sup>+</sup> dapat membentuk respon yang tepat untuk berbagai patogen. Namun, penelitian yang lebih baru telah menemukan adanya subpopulasi lain sel T helper yang juga penting dalam Imunoregulasi dan pertahanan inang. Salah satunya, sel T regulator (Treg) adalah subpopulasi terpisah dari sel T immunosupresif yang mengekspresikan Foxp3 sebagai faktor transkripsi. Data penelitian terakhir menyebutkan bahwa sel penghasil IL-17 adalah independen dan merupakan diferensiasi sel T CD4<sup>+</sup> baru yang disebut sel "Th17" (*T-helper* 17), diferensiasi sel T CD<sup>+</sup> ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Chen and O'shea, 2007; Zhu and Paul, 2008).



**Gambar 2.2** Diferensiasi sel T CD4. Sumber : Zhu *and* Paul (2008).

Fungsi sel T CD4<sup>+</sup> dalam kekebalan humoral adalah menstimulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel B, sedangkan dalam kekebalan seluler adalah mengaktifasi makrofag dan sekresi sitokin. Subset limfosit Th1 melalui produksi IFN $\gamma$ , IL-2 dan IL-12, sedangkan subset Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 dan IL-10. Sitokin yang dihasilkan sel Th1 menghambat kerja sel Th2, demikian pula sebaliknya sehingga respon imun cenderung memilih salah satu pola respon, pola respon Th1 atau pola respon Th2 (Tizard, 2000). IL-12 merupakan sitokin utama dan terpenting dalam menginduksi ke subset Th1, secara *in vitro* maupun *in vivo* (Trinchieri, 1995). Dilaporkan bahwa produk bakterial yang menghantar menuju ke subset Th1 ternyata bekerja melalui produksi IL-12 oleh *antigen presenting cell* (APC) seperti makrofag (Hsieh *et al.*, 1993). Kegagalan diferensiasi ke subset Th1 dan penurunan respon hipersensitivitas tipe lambat

terjadi karena mencit mengalami defisiensi gen IL-12 atau defisiensi protein *signaling* STAT-4 (Guler *et al.*, 1996).

Klasifikasi limfosit dengan ekspresi antigen CD sekarang banyak digunakan dalam pengobatan klinis dan eksperimental imunologi. Sel T helper, sebagai limfosit CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, dan CTLs kebanyakan CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>. Ilmuwan telah mengidentifikasi sel-sel yang berpartisipasi dalam berbagai respon imun, mengisolasi dan menganalisis kekhususan individual, respon pola, dan fungsi efektor. *Cluster differentiation* mirip antibodi juga telah digunakan untuk menentukan perubahan spesifik khususnya pada subset limfosit yang mungkin terjadi di berbagai penyakit. Sebagai contoh, menurunnya jumlah sel T CD4<sup>+</sup> darah sering digunakan untuk mengikuti perkembangan penyakit dan respon terhadap pengobatan *human immunodeficiency virus* (HIV) pada pasien yang terinfeksi. Penelitian lebih lanjut efek dari antibodi monoklonal pada fungsi limfosit telah menunjukkan bahwa protein permukaan tidak hanya sebagai penanda fenotipik tetapi berperan dalam berbagai respon limfosit. Fungsi yang dikaitkan dengan molekul CD adalah transduksi sinyal yang menyebabkan limfosit aktivasi (Abbas *and* Lichtman, 2006)

Peran utama sel T CD4<sup>+</sup> adalah untuk memastikan respon yang optimal oleh limfosit lainnya. Sel T CD4<sup>+</sup> diperlukan sebagai pembantu untuk mempromosikan produksi antibodi pada sel B dan sering diperlukan untuk generasi populasi sel sitotoksik dan memori T CD8<sup>+</sup>. Penelitian terbaru telah menyimpulkan peran tambahan untuk Sel T CD4<sup>+</sup> dalam meningkatkan respon imun bawaan dan dalam mediasi fungsi efektor antivirus (Swain *et al.*, 2012).



Sel T CD4<sup>+</sup> yang berbeda subset termasuk sel TH1, sel TH17 dan sel T sitotoksik memiliki peran penting dalam respon antivirus. Peran kuncinya adalah penyediaan bantuan untuk sel B, namun sel T CD4<sup>+</sup> juga berkontribusi terhadap respon antivirus dengan memproduksi sitokin dan kemokin, dengan meningkatkan respon sel T CD8<sup>+</sup> dan melalui efek sitotoksik langsung pada sel yang terinfeksi virus (Swain *et al.*, 2012).

Kekebalan tubuh bersifat dinamis, ini berarti kekebalan tubuh dapat menurun atau meningkat. Penurunan sistem imun bisa bersifat ringan, sedang atau berat. Infeksi virus secara umum dapat menurunkan kekebalan tubuh, beberapa contohnya adalah infeksi SARS, HIV, Avian influenza dan Dengue. Pada infeksi HIV, penurunan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> menyebabkan disfungsi sel - sel T CD8<sup>+</sup>, *natural killer cells* dan sel sel B yang menyebabkan tingginya titer virus pada fase infeksi kronis. Infeksi Dengue berhubungan dengan perubahan angka Sel T CD4<sup>+</sup>, Sel TCD8<sup>+</sup> dan sel *Natural Killer* (NK) (Karnen dkk., 2003; Gurugama *et al.*, 2010; Tenaya, 2011).

#### 2.4 Interferon Gama (IFN $\gamma$ )

Jaringan sitokin (*cytokines network*) mengatur pertumbuhan dan fungsi sel-sel dari sistem kekebalan tubuh. Sel T memiliki peran dominan dalam jaringan ini karena adalah sumber utama dari banyak sitokin. sitokin memegang peranan penting dalam mengatur respon imun adaptif dan sel T merupakan sumber sitokin yang bersifat primer ataupun *memory immune responses*. Sel-sel T CD4<sup>+</sup> adalah sumber utama sitokin, yang terbagi menjadi tipe Th1 (menghasilkan IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) dan tipe Th2 (menghasilkan IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10).

Produksi sitokin yang berbeda diatur secara khusus melalui interaksi sel dan konsentrasi sitokin serta sangat bergantung pada pola diferensiasi dari sel T. Sitokin Th1 dan Th2 mengerahkan regulasi saling silang pada prekursor dari Th1-Th2 atau tipe sel efektor yang merupakan mediator penting dalam mengarahkan sistem kekebalan tubuh terhadap respon yang tepat (Huang *et al.*, 2008; Tenaya, 2011).

Sitokin adalah golongan protein (glikoprotein atau polipeptida) yang larut dan diproduksi oleh limfosit dan sel-sel lain seperti makrofag, eosinofil, sel mast dan sel endotel. Peran sitokin sebagai sinyal interseluler yang mengatur hampir semua proses biologis penting seperti aktivasi, pertumbuhan, proliferasi, diferensiasi, proses inflamasi, imunitas serta pertahanan jaringan. Kesemuanya terjadi akibat rangsangan dari luar. Berat molekul sitokin 8-40kDa dan kadarnya sangat rendah (Soeroso, 2007).

Sitokin yang berperan dalam *innate immunity* dan *adaptive immunity* adalah IFN $\gamma$ . Peranan penting IFN $\gamma$  dalam pembentukan subset Th1, terbukti dari pengujian *in vitro* bahwa netralisasi terhadap IFN $\gamma$  dapat menghambat pembentukan subset Th1 tetapi sebaliknya meningkatkan pembentukan subset Th2 (Abbas *et al.*, 1996). Studi menggunakan mencit transgenik diketahui bahwa makrofag mencit yang tidak sensitif terhadap IFN $\gamma$  tidak efisien dalam proses pembentukan subset Th1 karena mencit tersebut tidak mampu memproduksi IL-12 (Gazzinaeli *et al.*, 1993). Pembentukan *subset* Th1 adalah dalam mempertahankan subunit  $\beta$ 2 dari reseptor IL-12, sehingga tetap mempertahankan sensitivitas sel T terhadap IL-12. Penghambatan perkembangan dari fenotipe Th2

terdiri dua cara, yakni: IFN $\gamma$  menghambat sintesis IL-4 oleh sel T yang distimulasi antigen. Hal ini berarti IFN $\gamma$  menghambat produksi sitokin yang diperlukan guna menghantar pembentukan fenotipe Th2; IFN $\gamma$  menghambat ekspansi sel Th2 dengan cara menghambat langsung proliferasi sel-sel Th2 tersebut. Imunitas seluler melalui pembentukan sel-sel Th1 distimulasi secara simultan oleh IFN $\gamma$  (Abbas *et al.*, 1996).

Sel-sel tubuh manusia membentuk 3 jenis IFN yang mempunyai sifat antigenik yang berbeda, yaitu IFN $\alpha$  yang diproduksi leukosit, IFN $\beta$  yang diproduksi oleh fibroblast dan IFN $\gamma$  yang diproduksi oleh sel limfosit yang diaktifkan. IFN diproduksi oleh sel NK, sel CD4<sup>+</sup> Th1, dan sel T CD8<sup>+</sup>, yang merupakan sitokin penanda subset Th1. Sel NK mensekresi IFN $\gamma$  dalam menanggapi pengenalan komponen mikroba yang tidak diketahui atau sebagai respons terhadap IL12; dalam hal pengaturan ini, IFN $\gamma$  berfungsi sebagai mediator kekebalan bawaan (*innate immunity*). sel T dalam kekebalan adaptif, menghasilkan IFN $\gamma$  menanggapi pengenalan antigen, dan produksi ditingkatkan oleh stimulasi IL-12 dan IL-18 (Abbas *et al.*, 1996; Djayakusumah, 2010).

Percobaan yang dilakukan pada mencit yang dihilangkan gen IFN $\gamma$  dan reseptornya menunjukkan bahwa mencit itu mengalami berbagai cacat imunologik, diantaranya peningkatan kerentanan terhadap infeksi dengan mikroorganisme intraseluler, penurunan produksi nitrit oksida oleh makrofag, penurunan ekspresi molekul MHC kelas II pada permukaan makrofag setelah infeksi dengan *mycobacteria*, penurunan kadar IgG2 dan IgG3 dalam serum dan defek fungsi sel NK (Tizard, 2000) dikutip dari Wiedosari (2007).

Kemampuan IFN sebagai antivirus, anti proliferasi dan imunoregulator, pada infeksi menular seksual, diberikan pada pengobatan kondiloma akuminata dan sarkoma Kaposi terkait AIDS. Pemberian IFN melalui suntikan intralesi, sebagai preparat topikal berupa krim dan dapat pula diberikan sebagai injeksi intramuskuler (IM) atau subkutan (SK). Kelemahan terapi interferon adalah efek samping. Pemberian IFN meskipun secara intralesi, dapat terjadi efek samping sistemik seperti perasaan lelah (96%), neutropenia/leukopenia (92%), demam (81%), mialgia (75%), anoreksia (69%), mual/muntah (66%), sakit kepala (62%), efek samping tersebut dikenal pula sebagai *influenza like symptoms* yang merupakan efek samping yang paling sering terjadi. Disamping itu dapat pula terjadi peningkatan fungsi hepar (63%), diare, trombositopeni dan aritmia. Efek samping dipengaruhi oleh besarnya dosis IFN yang diberikan. dan biasanya menghilang bila pemberian obat dihentikan atau diturunkan dosisnya (Djayakusumah, 2010).

Efek samping toksik dari IFN rekombinan telah membatasi nilai klinis terapi tersebut. Mengingat efek samping yang dialami dalam terapi sitokin, perlu mempertimbangkan penggunaan *phytotherapy* dalam modulasi ekspresi sitokin. Penelitian modulasi sitokin dari bahan tanaman telah menyimpulkan bahwa infusa Daun Jawer Kotok dapat meningkatkan ekspresi IFN $\gamma$  (Lutfi dkk., 2012). Ekstrak daun *Hippophae rhamnoides* mampu menginduksi dan meningkatkan IFN $\gamma$  pada sel diinfeksi virus *Dengue* tipe-2 yang mengindikasikan kemampuan antiviral, dibuktikan dengan pemeliharaan viabilitas sel dan penurunan *plaque* pada *plaque assay* (Jain *et al.*, 2008).

## 2.5 *Pheripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)*

Tubuh manusia dipelihara oleh sistem peredaran darah dinamis terdiri komponen seluler yang memiliki kemampuan pengembalian relatif cepat (Vlata *et al.*, 2006). PBMC diklasifikasikan sebagai jaringan ikat cairan, yang dapat disebut sebagai sel disuspensikan dalam matriks fluida berfungsi untuk menghubungkan sistem biologi keseluruhan pada tingkat fisiologis. Sel-sel darah juga terlibat dalam baris pertama dari kekebalan sistem pertahanan, menggunakan gudang neutrofil, eosinofil, basofil, sel B, sel T dan monosit untuk pertahanan melawan benda asing, cedera dan memberikan penghalang pelindung antara eksternal dan internal (Liew *et al.*, 2006).

Sel mononuklear darah perifer atau PBMC adalah sel darah dengan inti bulat (yaitu limfosit, monosit atau makrofag). Populasi limfosit terdiri dari sel T  $CD4^+$  dan  $CD8^+$  (~ 65%), sel B dan sel Natural Killer (~ 28% gabungan),  $CD14^+$  Monosit, dan Basofil, Neutrofil, Eosinofil, Sel dendritik (~7%). Peran penting PBMC dalam pertahanan kekebalan tubuh selama kondisi patologis dengan merangsang proses aktivasi, pembelahan sel dan diferensiasi untuk menghasilkan *pool* sel T efektor teraktivasi yang bereaksi terhadap antigen (Khanduja *et al.*, 2006 ; Winkler *et al.*, 2005).

Analisis respon Sel T untuk virus dengue adalah penting untuk memahami mekanisme pemulihan dari infeksi dan juga patogenesis demam berdarah. Tidak ada model hewan coba yang sangat memuaskan dalam menganalisis respon sel T terhadap virus dengue dan patogenesis demam berdarah, meskipun banyak peneliti telah berusaha untuk melakukannya. Analisis dengan *pheripheral blood*

*mononuclear cells* (PBMC) masih merupakan cara terbaik untuk menjelaskan respon spesifik sel T terhadap virus dengue (Kurane, 2011).

## 2.6 Virus Dengue Tipe-2

Virus dengue termasuk *family Flaviviridae*, *genus Flavivirus*. Genom virus dengue adalah, RNA tunggal *plus stranded* panjang hampir 11 Kb. Pembacaan terbuka bingkai kode tiga protein struktural (kapsid (C) protein, prem protein, dan amplop (E) protein) dan tujuh protein nonstruktural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4B dan NS5). Dengue virion memiliki bentuk bulat dan diameter 40-50 nm. Amplop itu merupakan lipid bilayer mengandung dua amplop-protein terkait: protein E dan M. Virus Dengue ditularkan ke manusia oleh nyamuk yang terinfeksi, terutama *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Manusia host alami virus *dengue*, terdiri empat serotipe: tipe 1, 2, 3 dan 4 (Kurane, 2011).

Target utama virus dengue adalah sel fagosit mononuklear seperti monosit dan dendritik, secara *in vitro* kedua sel tersebut terdapat pada sel PBMC (Souza, 2005). Wang *et al.* (2002), melaporkan virus Dengue tipe-2 dapat dideteksi secara *in vivo* dan mengindikasikan terjadinya replikasi virus pada sel PBMC. Mekanisme imunopatogenesis infeksi virus dengue melibatkan respon humoral berupa pembentukan antibodi yang berperan dalam proses netralisasi virus, sitolisis yang dimediasi komplemen dan sitotoksitas yang dimediasi antibodi. Sel limfosit T baik *T-helper* (CD4<sup>+</sup>) dan T sitotoksik (CD8<sup>+</sup>), monosit dan makrofag, sitokin juga terlibat serta aktivasi komplemen. Infeksi makrofag, monosit atau sel dendritik oleh virus Dengue melalui proses endositosis yang

dimediasi reseptor dan atau melalui ikatan kompleks virus antibodi dengan reseptor Fc. Infeksi ini secara langsung mengaktivasi sel *T helper* ( $CD4^+$ ) dan sel T sitotoksik ( $CD8^+$ ) yang menghasilkan limfokin dan  $IFN\gamma$  (Rena dkk., 2009).

## **BAB 3**

# **KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS**



## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Mekanisme pertahanan sistem imun terhadap mikroba terdiri dari: 1) *innate immunity* atau imun bawaan yang berperan dalam reaksi awal dan 2) *adaptive immunity* atau imun adaptif yang merupakan respon lanjutan. Imun adaptif dibagi menjadi dua tipe, yaitu : 1) *humoral immunity* atau imun humoral yang dimediasi antibodi pada mukosa dan darah yang diproduksi limfosit B dan 2) *cell mediated immunity* atau *cellular immunity* yang dimediasi limfosit T (Abbas and Litchman, 2006).

Peran limfosit dalam *cellular immunity* adalah sebagai pengatur sel imun dalam mengeliminasi mikroba dengan fagositosis. Sel-sel darah terlibat dalam baris pertama sistem imun, melalui *pool* neutrofil, eosinofil, basofil, sel B, sel T dan monosit untuk pertahanan terhadap antigen, cedera dan memberikan *barrier* pelindung antara eksternal dan internal (Abbas and Litchman, 2006; Liew *et al.*, 2006). Sel mononuklear darah perifer atau PBMC adalah sel darah dengan inti bulat (limfosit, monosit atau makrofag). Populasi limfosit terdiri dari sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> (~ 65%), sel B dan sel Natural Killer (~ 28% gabungan), CD14<sup>+</sup> Monosit, dan Basofil, Neutrofil, Eosinofil, Sel dendritik (~7%). Peran penting PBMC dalam pertahanan kekebalan tubuh selama kondisi patologis dengan merangsang proses aktivasi, pembelahan sel dan diferensiasi untuk menghasilkan *pool* sel T efektor teraktivasi yang bereaksi terhadap antigen (Khanduja *et al.*, 2006 ; Winkler *et al.*, 2005).

Mikroba intraseluler, seperti virus dan beberapa bakteri, bertahan hidup dan berkembang biak dalam fagosit dan sel inang lainnya, yang tidak dapat dijangkau peredaran antibodi. Pertahanan melawan infeksi adalah fungsi *cellular immunity* dalam penghancuran mikroba yang berada difagosit atau membunuh sel yang terinfeksi untuk menghilangkan reservoir infeksi (Abbas *and* Lichtman, 2006). Penelitian pada sel PBMC yang distimulasi dengan antigen dengue spesifik secara *in vitro* menunjukkan peningkatan ekspresi IFN $\gamma$ , IL2, IL4 dan TNF $\beta$  setelah 2 atau 3hari paska stimulasi. Berdasarkan analisis ekspresi penanda permukaan sel (*surface markers*) menunjukkan sel TCD4 $^+$ , CD8 $^+$  adalah produsen utama dari sitokin tersebut (Mori *et al.*, 1997). Sekresi IFN $\gamma$  dan TNF $\alpha$  meningkat signifikan pada pasien paska infeksi dengue (Chaturvedi *et al.*,2000; Nguyen *et al.*,2004; Ganda, 2010).

Molekul yang terlibat mengenal antigen virus Dengue adalah MHC I atau *Human Lekocyte Antigen* (HLA) molecules yang akan terekspresi pada sel yang disebut APC dan selanjutnya akan mengalami proses imun pada tubuh hospes. Antigen yang bermuatan MHC I akan diekspresikan dipermukaan virus sehingga dikenali oleh limfosit T CD8 $^+$ , limfosit T akan teraktivasi yang bersifat sitolitik, sehingga semua sel mengandung virus dihancurkan dan juga mensekresi IFN $\gamma$  dan TNF $\alpha$ . Pada infeksi kedua yang dipicu oleh virus dengue dengan serotipe yang berbeda Virus dengue berperan sebagai super antigen setelah difagosit oleh monosit atau makrofag yang menampilkan APC. Antigen yang bermuatan peptida MHC II akan berikatan dengan CD4 $^+$  (TH-1 dan TH-2) dengan perantaraan *T Cell Receptor* (TCR) sebagai usaha tubuh untuk bereaksi

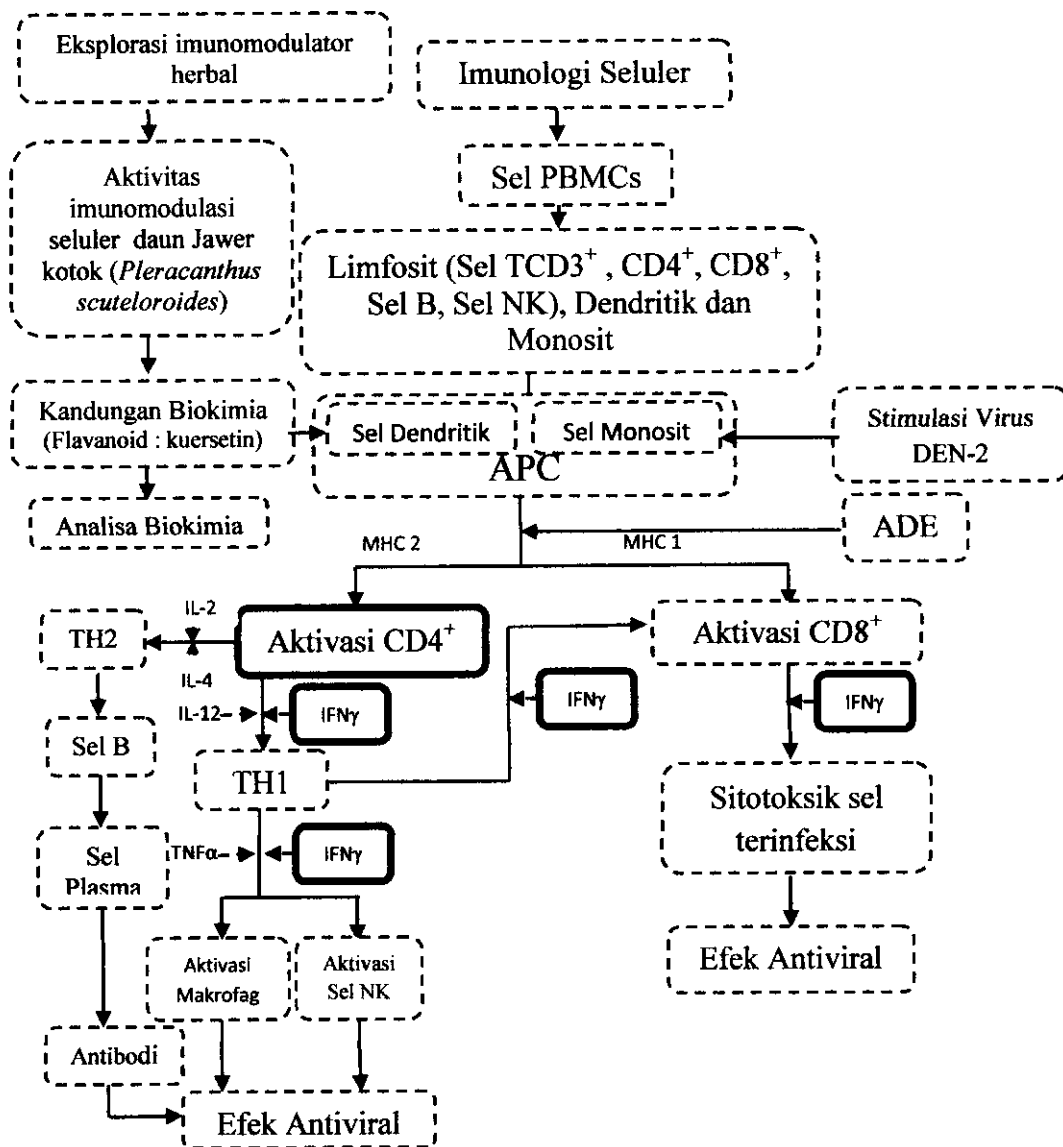
terhadap infeksi, maka limfosit T akan mengeluarkan substansi dari TH-1 yang berfungsi sebagai imunomodulator yaitu IFN gama, IL-2 dan CSF (*Colony Stimulating Factor*) (Soegijanto, 2006).

Infeksi Dengue berhubungan dengan perubahan angka Sel T CD4<sup>+</sup>, Sel TCD8<sup>+</sup> dan sel *Natural Killer* (NK) (Karnen dkk., 2003; Gurugama *et al.*, 2010; Tenaya, 2011). Bukti eksperimental menunjukkan bahwa respon kekebalan setelah infeksi atau vaksinasi dapat dipengaruhi oleh obat-obatan yang berasal dari tumbuhan. Kemampuan untuk memodulasi fungsi kekebalan tubuh memberikan manfaat dalam menjaga kesehatan melalui imunostimulan atau immunosupresan. Tanaman obat-obatan memodulasi kekebalan melalui interaksi seluler dan molekuler pada *antigen presenting cell* (terutama sel dendritik) yang mempresentasikan MHC 1 dan MHC 2, limfosit T dan limfosit B. Aktivasi sel T dalam respon imun dapat dilakukan dengan senyawa dengan antigenitas rendah dan secara berulang (Patel, 2012).

Substansi atau obat yang dapat memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun disebut imunomodulator. Sifat bahan imunomodulator memiliki antigenitas sedikit sekali, sebagian bekerja sebagai mitogen yaitu meningkatkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas (Wiedosari, 2007; Widiyanto, 1987). Sebagian besar agen imunomodulator memainkan peran dalam mempertahankan sistem kekebalan tubuh dengan meningkatkan aktivitas sel T, mengurangi atau memblokir aktivitas supresor, merangsang sel-sel *Natural Killer* (NK sel) dan produksi interferon serta menginduksi produksi sitokin spesifik oleh sel target yang diaktifkan (Gabiuis, 2003; Stanilove *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2010).

Tanaman yang berpotensi sebagai imunomodulator salah satunya Daun Jawer kotok tetapi potensi imunomodulasi sebagai imunoterapi sel T dan sitokin belum diteliti. Peningkatan dosis kombinasi buah sirih (*Piper betle* L), Jawer kotok (*Plectranthus scutellarioides* L. R. BR), madu dan kuning telur meningkatkan aktivitas dan kapasitas sel makrofag dibandingkan dengan kontrol negatif pada infeksi *Staphylococcus aureus* pada mencit jantan (Nugroho, 2011). Analisis HPLC ekstrak Daun Jawer kotok mengandung 0,05% kuersetin. Kandungan kuersetin pada daun jambu biji dapat menghambat virus Dengue dan meningkatkan trombosit (Moektiwardoyo, 2011; Achmad 2001 dan Soegijanto, 2010). Ekstrak daun *Hippophae rhamnoides* yang mengandung kuersetin mampu menurunkan kadar sekresi TNF $\alpha$  tapi meningkatkan kadar sekresi IFN $\gamma$  dan memiliki aktivitas antiviral pada kultur makrofag manusia yang diinfeksi virus dengue tipe 2 (Jain *et al.*, 2008). Infusa daun Jawer kotok dengan dosis 5 $\mu$ l pada sel PBMC berpotensi sebagai imunomodulator yang berperan sebagai imunostimulan aktivasi sel T CD3 $^{+}$ , CD4 $^{+}$  dan meningkatkan ekspresi IFN $\gamma$  (Lutfi dkk., 2012).

Berdasarkan uraian di atas yang terangkum dalam kerangka konseptual Gambar 3.1, ekstrak metanol Daun Jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*) diharapkan mampu memodulasi ekspresi sel T CD4 $^{+}$  dan sekresi IFN $\gamma$  pasca infeksi Virus Dengue tipe 2 pada sel PBMC.



**Gambar 3.1** Kerangka konseptual penelitian. Keterangan : — = variabel yang diteliti. - - - = variabel yang tidak diteliti.

### 3.2 Hipotesis

Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthrantus scutellaroides*) dosis 5 $\mu$ g dan 10 $\mu$ g memiliki potensi imunomodulator dalam meningkatkan ekspresi Sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC manusia yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2.

## **BAB 4**

# **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## BAB 4 MATERI DAN METODE

### 4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari s/d Juni 2013, yang bertempat: Laboratorium Uji dan Layanan Jasa Industri Fakultas Farmasi, Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Laboratorium *Dengue* dan Stem sel *Institut Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Imunologi *Diagnostic Center* RSUD Dr Soetomo Surabaya.

### 4.2 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental*, dengan rancangan *The Post Test – Only Control Groups Design* yang menggunakan sel PBMC *Pheriperal Blood Mononuclear Cells* (PBMC) sebagai objek penelitian.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel bebas

Pemberian dosis ekstrak daun Jawer kotok (*Plectranthus Scutellaroides*)

#### 4.3.2 Variabel tergantung

- 1) Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup>
- 2) Kadar IFN $\gamma$

### 4.3.3 Variabel kendali

- 1) Kultur PBMC
- 2) Masa inkubasi
- 3) Waktu pengamatan

### 4.3.4 Definisi operasional

- 1) Pemberian dosis ekstrak daun Jawer kotok (*Plectranthus Scutellaroides*) adalah pemberian ekstrak dengan dilarutkan dalam suspensi DMSO 0,01% dengan konsentrasi 1:10, selanjutnya diinokulasikan 50µg (ekuivalen 5µg ekstrak murni) atau 100µg (ekuivalen 10µg ekstrak murni) pada kultur PBMC.
- 2) Ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> adalah jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang diukur dari pelet kultur sel PBMC dengan metode *flowcytometri*.
- 3) Kadar IFN $\gamma$  adalah kadar kuantitatif IFN $\gamma$  yang diukur dari supernatan kultur sel PBMC dengan metode ELISA.
- 4) Kultur PBMC adalah kultur sel darah tepi yang diisolasi dari darah utuh menggunakan Ficol 1,077 dari *buffy coat* yang terbentuk dipurifikasi, ditanam pada media *Alfa MEM (Minimum Essential Medium)* ditambah FBS 10%, penisilin streptomisin 1/1000 IU, fungisol dan diinkubasi pada inkubator suhu 37°C, 5%CO<sub>2</sub> selama 24jam.
- 5) Masa inkubasi adalah waktu inkubasi pada inkubator suhu 37°C, 5%CO<sub>2</sub> yang meliputi inkubasi adsorpsi virus (2 jam inkubasi setelah inokulasi virus *Dengue tipe2*) dan inkubasi pertumbuhan sel selama 48jam.



- 6) Waktu pengamatan adalah saat pengamatan setelah 24 jam inkubasi pertumbuhan kultur PBMC, satu jam setelah inkubasi infeksi virus *Dengue*, setelah 48 jam inkubasi pemberian ekstrak methanol daun Jawer kotok (*Plectranthus Scutellaroides*).

#### 4.4 Populasi, Besar sampel dan Teknik Pengambilan sampel

Populasi penelitian ini adalah kultur sel PBMC dari manusia sehat. Sampel yang digunakan adalah kultur sel PBMC dari manusia sehat, berumur 20-35 tahun dengan besar sampel 30 sel kultur yang terdiri enam kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok lima ulangan. Teknik pengambilan sampel secara *simple random sampling* dari sel kultur PBMC individu yang terpilih yang dibagi dalam perlakuan atau kontrol (Soegiyono, 2010).

#### 4.5 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan kultur sel PBMC adalah Darah utuh, heparin, PBS (*Phosphate Buffer saline*), *minimum essential medium alpha medium* (alfa MEM), (no katalog 11900-024), Antibiotik (Penicillin-streptomycin P4333), *Fetal Bovine Serum* (no catalog S1810-500), *Ficoll Histopaque* (no catalog 10771), dan Fungisol. Pembuatan Ekstrak dan homogenisasi dibutuhkan bahan daun Jawer kotok segar, Methanol teknis, pelarut DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) 0,01% dan aquades steril. Analisa *Flow cytometry* dibutuhkan bahan: FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) Anti CD4<sup>+</sup> dan reagen FACS 10x (*Fluorescence-activated cell sorting*). Pemeriksaan ELISA kadar IFN $\gamma$  dibutuhkan bahan: PBS (*Phosphate Buffer saline*), ELISA kit *human* Anti IFN $\gamma$ , larutan

*biotin konjugat*, larutan konjugat *Streptavidin-HRP*, larutan substrat TMB, larutan *stop solution* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Alkohol 70% dan spidol. Bahan kontrol positif menggunakan ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*).

#### **4.6 Instrumen Penelitian**

Penelitian ini dibutuhkan instrumen: tabung erlenmeyer, penyaring *buchner*, evaporator *buchi*, spuit 10 cc, *conical tube*, microtube, Sentrifugasi dengan pengatur suhu, tabung sentrifuse 15cc, Cawan 24 *wells*, *microplate* 96 well, Pippet pasteur, Pippet eppendorf, Kabinet laminar flow kelas II, Mikroskop, vortex, Bunsen, Sprayer, Timbangan, *Flowcytometer* dan *ELISA Microplate Reader* ELX 800.

#### **4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Teknik Sampling dan Kelompok Perlakuan**

Randomisasi dilakukan menggunakan kartu undian. Kelompok penelitian dibagi menjadi lima yaitu kelompok kontrol (K), kontrol ekstrak Jawer kotok non infeksi (P0), kontrol infeksi(P1), Kontrol pembanding ekstrak Meniran (P2), Perlakuan satu (P3) dan Perlakuan dua (P4) dengan masing-masing lima ulangan (Soegiyono, 2010).

##### **4.7.2 Prosedur identifikasi dan ekstraksi daun Jawer kotok(*Plectranthus Scutellaroides*)**

Tanaman dan Daun jawer kotok segar diambil dari Kebun Toga Wahyu Alam Kediri sebanyak 500gr. Sampel tanaman diperiksa secara makroskopis anatomi untuk pemeriksaan identifikasi spesies tanaman di Laboratorium

Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya. Sampel daun segar diseleksi, dicuci bersih, digunting kecil-kecil dan dikering anginkan pada temperatur ruangan tanpa terkena sinar matahari langsung selama tiga hari, sehingga didapatkan berat 100gr daun kering.

Proses ekstraksi melalui dua tahapan, yang pertama maserasi yaitu merendam daun dengan larutan air dan methanol 1:1 selama 2 x 24 jam. Tahap kedua adalah pengambilan supernatan diambil dengan penyaring *buchner* dan dilakukan evaporasi pada suhu 40-50°C untuk memisahkan pelarut methanol, hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental ini, berikutnya disebut ekstrak methanol daun Jawer kotok (*Plectranthus Scutellaroides*) konsentrasi 100% (Moektiwardoyo dkk., 2011).

#### 4.7.3 Prosedur pembuatan kultur PBMC

Darah tepi diambil secara aseptik dari vena cubiti oleh tenaga ahli dengan spuit sebanyak 20ml dari individu sehat, umur 20-35tahun. Darah dimasukkan ke dalam tabung 50ml yang sudah berisi antikoagulan heparin, dalam kabinet laminar flow kelas II. Darah diencerkan darah dengan PBS (1:1). Ditambahkan Ficoll secara hati-hati melalui tepi tabung. Sentrifugasi pada 833 xg selama 20 menit, pada 20°C. Hati-hati diambil tabung dari centrifuge sementara tidak mengganggu lapisan layer.

Secara hati-hati *bufy coat* (lapisan PBMC) diaspirasi dari tabung dan ditransfer ke tabung 15 ml baru. Sisa Ficoll dibuang dan sel-sel darah merah dalam tabung tertutup. PBMC dicuci dengan menambahkan cukup PBS. Sentrifuse larutan pada 425 xg. Dituang supernatan, diresuspensi pelet dan cuci

sekali lagi di PBS. Tanam sel PBMC pada media kultur (alfa MEM; FBS 10%; Penisilin streptomisin 1/1000 IU; Fungisol) Inkubasi pada inkubator temperatur 37°C, 5%CO<sub>2</sub> selama 24 jam (Rantam, 2005).

#### **4.7.4 Prosedur pemberian ekstrak daun Jawer kotok (*Plectranthus Scutellaroides*) pada kultur PBMC**

Ekstrak kental dilarutkan dengan DMSO 0,01%, perbandingan 1:10 dalam microtube 1ml. Selanjutnya diresuspensi dengan pipet secara hati-hati, hingga tercampur homogen. Larutan diambil dengan pipet eppendorf larutan 50µl (konsentrasi ekstrak 5µl) dan atau 100µl (konsentrasi ekstrak 10µl) sesuai perlakuan. Diinokulasikan secara hati-hati pada kultur sel PBMC dan inkubasi pada inkubator temperatur 37°C, 5%CO<sub>2</sub> selama 48jam.

Kelompok penelitian dibagi menjadi enam yaitu kelompok kontrol (K), kontrol ekstrak Jawer kotok (P0), kontrol infeksi (P1), kontrol pembanding Meniran (P2), Perlakuan satu (P3) dan Perlakuan dua (P4). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut : K : Kelompok kontrol, kultur sel PBMCs yang diinokulasikan 5µl DMSO 0,01%. P0 : kontrol ekstrak Jawer kotok, kultur sel PBMCs yang diinokulasi 5µg ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutelloroides*). P1 : Kelompok kontrol infeksi, kultur sel PBMCs yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2 yang diinokulasikan 5µl DMSO 0,01%. P2 : Kelompok pembanding dengan ekstrak meniran, kultur sel PBMCs yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2 yang diinokulasi 5µg ekstrak meniran (*Phylantus niruri*). P3 : Kelompok perlakuan satu, kultur sel PBMCs yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2 dengan diinokulasi 10µg ekstrak daun Jawer kotok(*Plecthrantus Scutelloroides*).

P4 : Kelompok perlakuan dua, kultur sel PBMCs yang diinfeksi virus *Dengue* tipe 2 dengan diinokulasi 5 $\mu$ g ekstrak daun Jawer kotok(*Plecthrantus Scutelloroides*).

#### 4.7.5 Prosedur infeksi virus *Dengue* tipe 2 pada kultur PBMC

Infeksi virus dilakukan dengan diambil suspensi virus *Dengue* tipe 2 dengan titer  $1,1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> sebanyak 5 $\mu$ l/ml per wells. Selanjutnya diinokulasikan dengan hati-hati pada sel kultur PBMC dengan pipet steril. Diinkubasi pada inkubator temperatur 37°C, 5%CO<sub>2</sub> selama dua jam untuk proses adsorpsi virus ke dalam sel. Sentrifuse 1200 rpm selama 5 menit, dibuang supernatan dan diganti dengan media FBS 2% (Reis *et al.*, 2008).

#### 4.7.6 Prosedur *flow cytometri* pemeriksaan ekspresi sel T CD 4<sup>+</sup>

Pellet kultur sel dipipet sebanyak 50 $\mu$ l ke dalam tabung Falcon berisi *beads*. Ditambahkan 10 $\mu$ l reagen Tritest CD3 FITC/CD4PE/CD45. Dicampur homogen pada vortex mixer, kemudian diinkubasi 15 menit pada suhu 20-25°C pada ruang gelap. Diencerkan larutan pelisis FACS 10x dengan aquades steril sebanyak 450 $\mu$ l kemudian dicampur homogen. Setelah inkubasi, sampel ditambahkan 450 $\mu$ l reagen FACS yang sudah diencerkan dicampur homogen kemudian diinkubasi pada ruang gelap selama 15 menit pada suhu 20-25°C. Setelah masa inkubasi selesai dilakukan analisa menggunakan alat FACS *flowcytometer* (Rantam, 2005; Lutfi dkk., 2012).

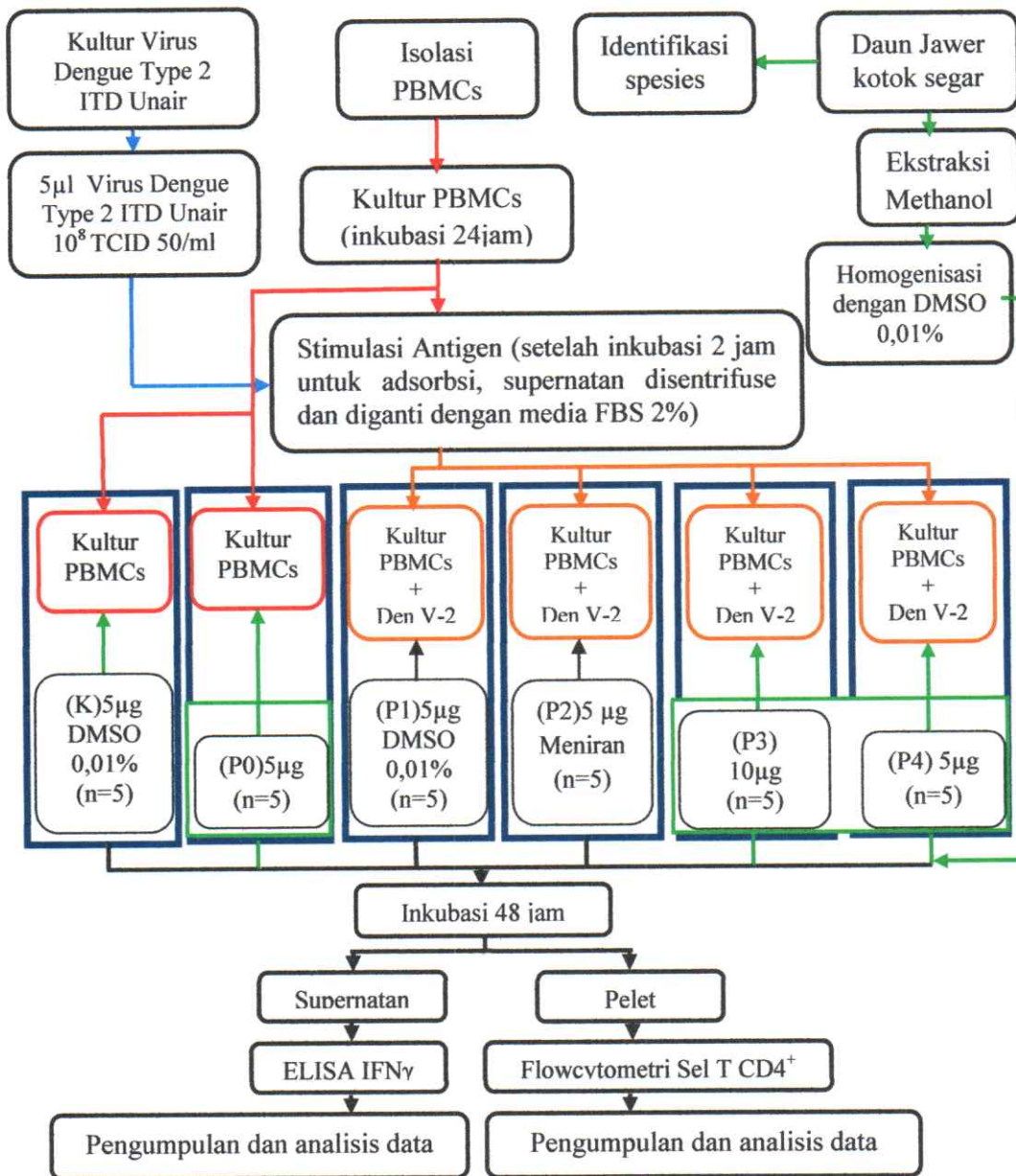
#### 4.7.7 Prosedur pemeriksaan ELISA IFN $\gamma$

Pemeriksaan dimulai dengan disiapkan *microplate* 96 sumuran yang telah dilapisi antibodi monoklonal terhadap human IFN $\gamma$ . *Microplate* dicuci dengan memasukkan buffer pencuci sebanyak 300 $\mu$ l setiap sumuran. Caranya dengan melakukan aspirasi berulang menggunakan pipet tanpa menggores permukaannya. Lakukan pengeringan dengan membalikkan mikroplate diatas kertas tissue selama  $\pm$  15 menit. Larutan standar dibuat dengan memasukkan 100 $\mu$ l larutan sampel dalam sumuran. Tambahkan 100 $\mu$ l larutan standar IFN- $\gamma$  dalam sumuran. Lakukan pengenceran bertahap sebanyak lima kali dengan memasukkan 100 $\mu$ l campuran larutan yang diambil dari sumuran pertama ke sumuran kedua dan seterusnya. Pada sumuran yang terakhir larutan dibuang. Semua dilakukan secara duplo. Larutan blangko dibuat dengan hanya memasukkan 100 $\mu$ l larutan sampel secara duplo.

Kultur yang akan diperiksa disiapkan dengan memasukkan 50 $\mu$ l larutan sampel dalam semua sumuran yang telah diisi 50  $\mu$ l kultur. Sebanyak 50  $\mu$ l larutan *biotin konjugat* ditambahkan ke semua sumuran termasuk sumuran blangko. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18 – 25 $^{\circ}$ C) selama 2 jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm. Buka *plate cover* , kosongkan sumuran dan dicuci 3X. 50  $\mu$ l larutan *Streptavidin-HRP* ditambahkan ke semua sumuran termasuk sumuran blangko. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18 – 25 $^{\circ}$ C) selama 1 jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm. *Plate cover* dibuka, sumuran dikosongkan dan dicuci 3X. 100  $\mu$ l campuran larutan *substrat TMB* ditambahkan ke semua sumuran

termasuk sumuran blangko. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18 – 25°C) selama 10 menit diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm. Hindari sinar matahari langsung. Amati terjadinya perubahan warna. Stop reaksi enzim dengan menambahkan 100µl *stop solution* dalam tiap sumuran. Baca absorbansinya pada gelombang 450 nm menggunakan *ELISA Microplate Reader ELX 800* (Purnama, 2008).

Metode penelitian secara operasional mulai dari pengumpulan daun Jawer kotok segar hingga pengumpulan data diilustrasikan pada bagan kerangka operasional penelitian pada Gambar 4.1.



**Gambar 4.1** Kerangka operasional. Den V-2 = *Dengue Virus type-2*

#### 4.9 Analisis Data

Data hasil penelitian meliputi : ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  setelah infeksi virus *Dengue* tipe 2 dan pemberian dosis ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthrantus scutelloroides*) dianalisis menggunakan ANOVA yang dilanjutkan uji HSD 5% (Steel and Torrie., 1995).



## **BAB 5**

# HASIL PENELITIAN

## BAB 5 HASIL

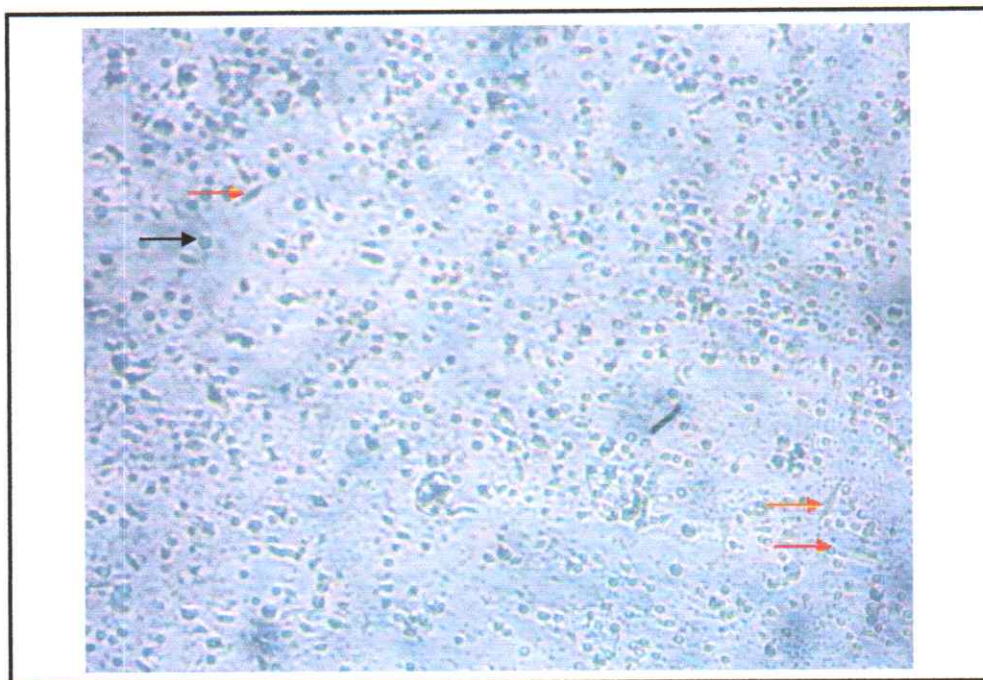
### 5.1 Ekspresi Sel T CD3<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>

Bahan asal tanaman dapat memacu berbagai komponen sistem imun non spesifik (fagosit dan sel NK) dan spesifik (proliferasi sel T dan sel B dalam memproduksi antibodi) serta produksi sitokin (Bratawijaya, 2006 ; Anderson *et al.*, 1999). Sel T dan sel B tidak dapat dibedakan dengan pengamatan dibawah mikroskop. Perkembangan kultur sel PBMC bisa menjadi salah satu indikasi potensi imunomodulasi suatu bahan. Sel induk mesenkim (*mesenchymal stem cell*) pada kultur PBMC menandakan komunikasi aktif antar sel (Rantam, 2005; Lutfi dkk., 2012). Kultur sel PBMC sebelum dan pasca infeksi tiap perlakuan bisa dilihat pada Gambar 5.1 dan 5.2, gambar lengkap pada Lampiran 2.

Limfosit dengan variasi subsetnya memiliki perbedaan glikoprotein pada permukaannya yang disebut CD (*cluster differentiation*). Klasifikasi limfosit dengan ekspresi antigen CD sekarang banyak digunakan dalam pengobatan klinis dan eksperimental imunologi. Sel T *helper*, memiliki penanda permukaan CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, dan CTLs penanda permukaannya adalah CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> (Abbas and Lichman, 2006). Potensi ekstrak daun Jawer kotok berdasarkan aktivasi sistem imun spesifik dapat diamati berdasarkan ekspresi sel T CD3<sup>+</sup>/CD45 dan CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>. Hasil pemeriksaan potensi imunomodulator ekstrak daun Jawer kotok terhadap ekspresi sel T CD3<sup>+</sup>/CD45 dan CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> dengan *flow cytometry*, secara deskriptif rata-rata dalam persen bisa dilihat pada Tabel 5.1.



**Gambar 5.1** Kultur sel PBMC Hari Pertama (inkubasi 24 jam, sebelum infeksi). Perbesaran 400x. Tanda panah warna hitam ( —→ ) menunjukkan sel PBMC.



**Gambar 5.2** Kultur Sel PBMC Hari Ketiga perlakuan P3 (48 jam pasca infeksi dan inokulasi ekstrak). Tanda panah warna hitam ( —→ ) menunjukkan sel PBMC. Tanda panah warna merah ( —→ ) menunjukkan sel Induk Mesenkim.

Tabel 5.1 Data potensi ekstrak jawer kotok terhadap ekspresi CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$ 

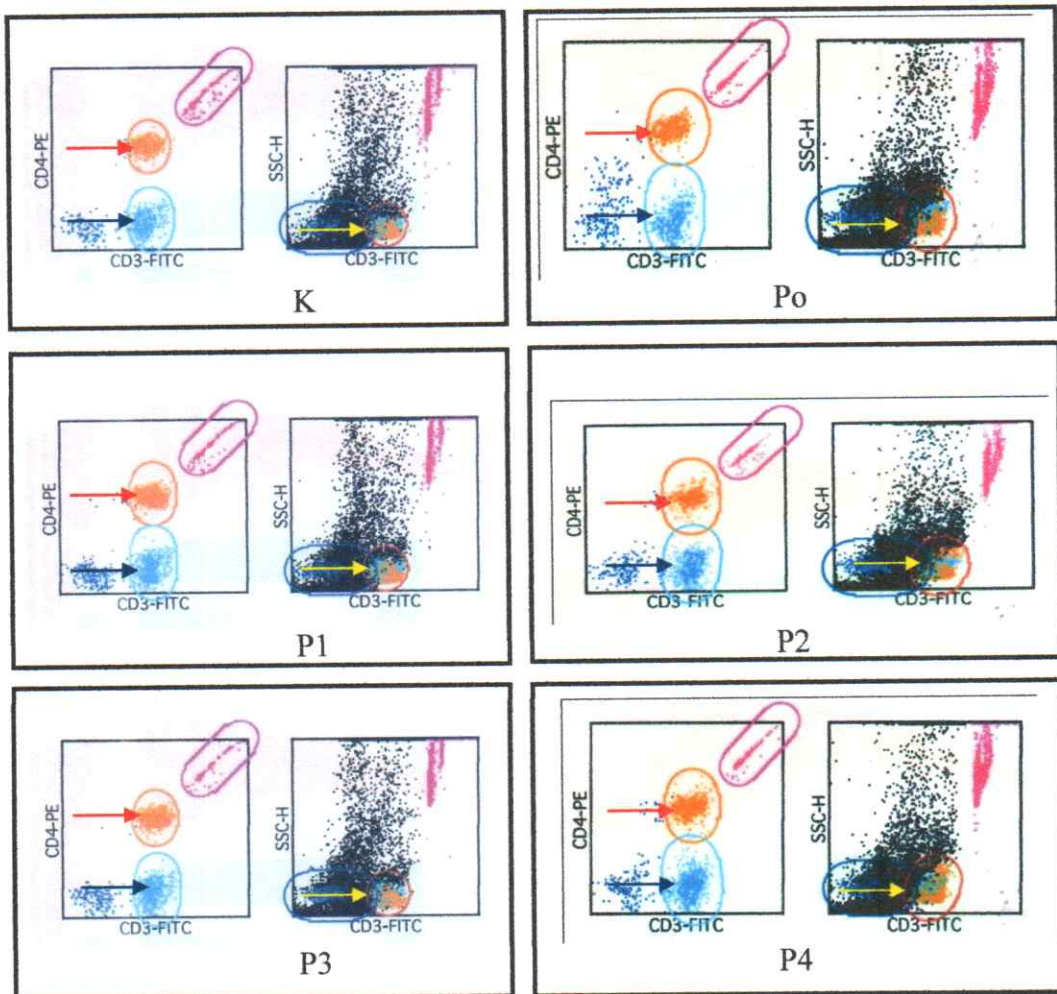
No.	Perlakuan	Ekspresi CD3 <sup>+</sup>	Ekspresi CD4 <sup>+</sup>	Kadar IFN $\gamma$ dalam pg/ml
1	K	74,85±4,82	37,26±1,78 <sup>b</sup>	65,28±7,03 <sup>b</sup>
2	P0	81,43±3,08	47,57±0,71 <sup>a</sup>	71,40±15,61 <sup>ab</sup>
3	P1	81,70±0,80	51,35±0,11 <sup>a</sup>	80,56±9,56 <sup>ab</sup>
4	P2	81,41±1,67	51,14±1,45 <sup>a</sup>	73,62±21,03 <sup>ab</sup>
5	P3	81,48±0,84	51,28±0,11 <sup>a</sup>	104,00±24,86 <sup>a</sup>
6	P4	80,10±3,13	45,52±4,53 <sup>ab</sup>	94,88±21,04 <sup>ab</sup>

Keterangan : Superskrip berbeda menunjukkan berbeda nyata, pada kolom masing-masing. K : Kelompok kontrol, P0 : kontrol ekstrak Jawer kotok, P1 : Kelompok kontrol infeksi, P2 : Kelompok pembandingan dengan inokulasi 5 $\mu$ g ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*), P3 : Kelompok perlakuan infeksi dengan inokulasi 10  $\mu$ g ekstrak daun Jawer kotok(*Plecthrantus Scutelloroides*), P4 : Kelompok perlakuan infeksi dengan diinokulasi 5 $\mu$ g ekstrak daun Jawer kotok(*Plecthrantus Scutelloroides*).

Data hasil ekspresi CD3<sup>+</sup>/CD45 pada hari kedua pasca infeksi Virus Dengue tipe-2 berdasarkan analisis ANOVA nilai *significant* = 0,168 berarti  $\geq$  0,05 yang menunjukkan bahwa tidak berbeda nyata antara K, Po, P1, P2, P3 maupun P4 sehingga tidak dilakukan uji lanjut, data lengkap pada Tabel 5.1.

Ekspresi CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> pada hari kedua pasca infeksi Virus Dengue tipe-2 berdasarkan analisis ANOVA dengan uji lanjut HSD dengan nilai  $P \leq 0,05$  menunjukkan kelompok P4 mengekspresikan lebih tinggi dibanding kontrol tetapi lebih rendah dibanding P0, P1, P2 dan P3. Kelompok P0, P1, P2 dan P3 mengekspresikan CD4<sup>+</sup> berbeda nyata lebih tinggi dibanding K dan lebih tinggi dibanding P4. Data analisis statistik lebih lengkap bisa dilihat pada Lampiran 5. Gambar hasil ekspresi CD3<sup>+</sup>/CD45 dan CD4<sup>+</sup>/CD3 dari masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.1, gambar lengkap pada lampiran 3 dan grafik pada Gambar 5.3.



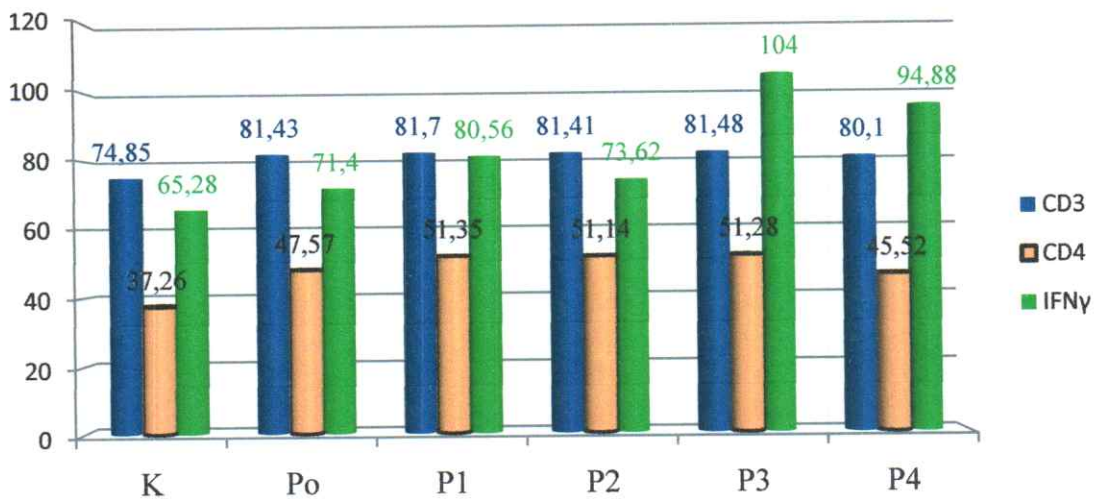


**Gambar 5.3** Ekspresi sel T  $CD3^+$  dan  $CD4^+$  setelah 48 jam inkubasi pasca infeksi. Keterangan: K : Kelompok kontrol, P0 : kontrol ekstrak Jawer kotok, P1 : Kelompok kontrol infeksi, P2 : Kelompok pembanding infeksi dengan inokulasi  $5\mu\text{g}$  ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*), P3 : Kelompok perlakuan infeksi dengan inokulasi  $10\mu\text{g}$  ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthrantus Scutelloroides*), P4 : Kelompok perlakuan infeksi dengan diinokulasi  $5\mu\text{g}$  ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthrantus Scutelloroides*). Tanda panah: warna merah menunjukkan ekspresi sel T  $CD4^+$ , warna biru menunjukkan ekspresi sel T  $CD3^+$ , warna kuning menunjukkan ekspresi  $CD3^+/CD45^+$ .

## 5.2 Kadar Sekresi Interferon Gama ( $IFN\gamma$ )

Pemeriksaan kadar sekresi  $IFN\gamma$  dengan metode ELISA pada kultur PBMC 48 jam inkubasi pasca infeksi virus *Dengue* tipe-2 rata-rata dalam pg/ml tiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.1. Berdasarkan hasil analisa ANOVA nilai *significant*  $\leq 0,05$  sehingga dilanjutkan dengan uji lanjut HSD dengan nilai P

$\leq 0,05$  menunjukkan kelompok P0, P1, P2 dan P4 memiliki kadar IFN $\gamma$  lebih tinggi dengan kelompok K (kontrol) dan lebih rendah dibanding kelompok P3, tetapi tidak berbeda nyata. Kelompok P3 menunjukkan kadar IFN $\gamma$  paling tinggi diantara semua kelompok perlakuan dan berbeda sangat nyata dengan kelompok K. Data nilai *optimum density* (OD) dan kadar IFN $\gamma$  lengkap bisa dilihat pada lampiran 4. Analisis statistik lengkap bisa dilihat pada Lampiran 5 dan deskripsi rata-rata kadar IFN $\gamma$  secara grafis bisa dilihat pada Gambar 5.4.



**Gambar 5.4** Grafik ekspresi rata-rata sel T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> dan Kadar IFN $\gamma$ .

## **BAB 6**

# PEMBAHASAN



## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1 Potensi Imunomodulasi Ekstrak Jawer Kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) Terhadap Ekspresi Sel T CD3<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>

Perkembangan pengetahuan tentang respon imun seluler terhadap infeksi dan penyakit lain, mendorong penelitian mengenai komponen yang dapat mempengaruhi komunikasi (interaksi) antar sel. Diferensiasi sel-sel induk mesenkim (*mesenchymal stem cell*) pada kultur PBMC merupakan salah satu indikator terjadinya komunikasi antar sel (Tzianabos, 2000; Rantam, 2005; Lutfi dkk., 2012). Morfologi sel induk mesenkim yang pipih dan memanjang dapat ditemukan dan terlihat jelas 48 jam inkubasi pasca inokulasi ekstrak dan infeksi pada perlakuan P0, P1, P2, P3 dan P4 tetapi sebaliknya tidak ditemukan pada kultur PBMC kontrol yang diberi DMSO 0,01%. Hasil penelitian Lutfi dkk. (2012) menyimpulkan pada kultur sel tersebut telah terjadi komunikasi antar sel melalui jalur autokrin dan parakrin. Senyawa kimia dari daun Jawer kotok dan Meniran dapat merangsang sel untuk mengekspresikan sitokin IFN $\gamma$ .

Sel T merupakan sebagian besar limfosit yang beredar dalam sirkulasi jumlahnya antara 65-85 persen. Kultur sel PBMC terdiri dari sel-sel mononuklear terdiri sel limfosit, monosit dan dendritik sel. Pemeriksaan dengan mikroskop tidak bisa membedakan sel T dengan sel B. Glikoprotein penanda permukaan (*surface marker*) pada limfosit yang disebut CD (*cluster differentiation*) yang digunakan sebagai identifikasi. Molekul CD berfungsi dalam interaksi antar sel dan adhesi serta transduksi sinyal yang mengaktivasi limfosit. Penanda fenotipik sel T adalah CD3<sup>+</sup> (Nurrahman, 1998; Abbas *and* Lictman, 2006).



Glikoprotein CD3<sup>+</sup> merupakan bagian integral dari reseptor sel T (TCR). Fungsi utama CD3<sup>+</sup> adalah sebagai molekul transduksi sinyal yang menghubungkan permukaan membran sel dengan unsur genetik. Peran lain CD3<sup>+</sup> adalah menekan fungsi kompleks TCR setelah reseptor TCR terikat, hal ini mengakibatkan energi sementara yang penting pada respon imun sel T terhadap antigen (Roitt, 1991; Kresno, 1996). Berdasarkan hal tersebut peningkatan persentase CD3<sup>+</sup> akan meningkatkan respon imun sel T terhadap antigen (Nurrahman, 1998).

Ekspresi CD3<sup>+</sup> pada kontrol dan perlakuan masing-masing tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata, berbeda dengan hasil penelitian Lutfi dkk. (2012), yang menyatakan infusa daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) dosis 5µg dapat meningkatkan ekspresi CD3<sup>+</sup> sel T dibanding kontrol. Perbedaan ini dikarenakan pada penelitian ini kultur hanya dilakukan selama 48 jam pasca infeksi dan inokulasi ekstrak, sementara inkubasi pada penelitian Lutfi dkk. (2012) diinkubasi selama 72 jam pasca inokulasi ekstrak, sesuai dengan penelitian Mori *et al.* (1997) yang menyatakan ekspresi CD3<sup>+</sup> meningkat terus dari hari pertama sampai 3 hari pasca infeksi virus dengue seiring produksi IFN $\gamma$ . Hasil ekspresi CD3<sup>+</sup> yang tidak berbeda nyata menandakan Limfosit T sebagai target sel dasar untuk diaktivasi imunomodulator dalam jumlah yang seragam.

Infeksi virus Dengue tipe-2 pada kultur PBMC baik yang dinokulasi ekstrak daun Meniran (*Phylantus niruri*) (P2) atau ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) (P3 dan P4) maupun yang tidak diinokulasi ekstrak (P1) tidak menunjukkan perbedaan antar perlakuan pada ekspresi sel T CD3<sup>+</sup>.

Hasil penelitian Mori *et al.* (1997) tentang produksi sitokin oleh limfosit T pada PBMC yang distimulasi antigen responsif secara *in vitro* dan diperiksa menggunakan teknik imunositokimia ganda, menyimpulkan mendukung hipotesis bahwa CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> sel T yang dirangsang antigen menghasilkan sitokin yang berperan dalam patogenesis infeksi virus dengue, sedangkan CD3<sup>+</sup> tidak berperan signifikan.

Bagian dari limfosit T yang berperan penting dalam respon imun seluler adalah CD4<sup>+</sup>. Keberadaan dan fungsi populasi CD4<sup>+</sup> seperti sel T regulator (Treg), TH17 dan TH9 berkontribusi dalam keseimbangan antara sehat dan sakit. CD8<sup>+</sup> sama pentingnya dalam aksi untuk menghancurkan dan menyingkirkan sel terinfeksi virus dan sel tumor. Penemuan obat derivat dari tanaman yang dapat memodulasi fungsi CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> akan penting untuk senyawa yang berpotensi dalam terapi (Patel, 2012).

Hasil rata-rata Perlakuan PO, P1, P2, P3 dan P4 mengekspresikan CD4<sup>+</sup> lebih tinggi dibanding kontrol (K). Nilai ekspresi CD4<sup>+</sup> P4 tidak berbeda nyata dengan kontrol. Perlakuan P0, P1, P2 dan P3 berbeda nyata dengan kontrol (K) dan P4. Perlakuan kelompok P1, P2, P3 lebih tinggi dalam mengekspresikan CD4<sup>+</sup> karena pengaruh infeksi virus Dengue tipe-2, sesuai hasil penelitian Kurane *et al.* (1991), yang menyatakan CD4<sup>+</sup> lebih tinggi pada satu dan dua hari pasca infeksi pada PBMC pasien *dengue fever* dibanding individu sehat tetapi lebih rendah dari *dengue hemoraghic fever*.

Mikroba intraseluler, seperti virus dan beberapa bakteri, bertahan hidup dan berkembang biak dalam fagosit dan sel inang lainnya, yang tidak dapat dijangkau peredaran antibodi. Pertahanan melawan infeksi adalah fungsi *cellular immunity* dalam penghancuran mikroba yang berada difagosit atau membunuh sel yang terinfeksi untuk menghilangkan reservoir infeksi (Abbas *and* Liethman, 2006). Infeksi Dengue berhubungan dengan perubahan angka Sel T CD4<sup>+</sup>, Sel TCD8<sup>+</sup> dan sel *Natural Killer* (NK) (Karnen dkk., 2003; Gurugama, *et al.*, 2010; Tenaya, 2011). Penelitian Chase *et al.* (2011), menyatakan infeksi virus *Dengue* tipe-2 pada kultur sel dendritik *in vitro* meningkatkan proliferasi CD4<sup>+</sup>, berbeda dengan kultur sel dendritik yang tidak diinfeksi.

Penelitian ini menggunakan ekstrak Meniran komersial karena sebagai satu-satunya tanaman herbal asli Indonesia yang sudah lulus uji pra klinis dan klinis sehingga terdaftar sebagai obat imunomodulator kategori fitofarmaka. Akar dan daun Meniran kaya senyawa flavonoid, antara lain filantin, hipoflantin, quercetrin, isoquercetin, astragalin dan rutin. Hasil uji klinis ekstrak Meniran pada manusia dinyatakan mampu meningkatkan kadar IFN $\gamma$ , kadar CD4<sup>+</sup> dan menghambat DNA polimerase virus Hepatitis (Sastroasmoro dkk., 2004).

Protein virus *Dengue* baru disintesis masuk MHC kelas I dan II serta presentasi epitop peptida virus disajikan pada permukaan sel dalam alur pengikatan molekul MHC. Molekul MHC kelas II menyajikan peptida sel T CD4<sup>+</sup>, yang menghasilkan sitokin dan mampu melisiskan sel yang terinfeksi. Molekul MHC kelas I menyajikan peptida untuk CD8<sup>+</sup> sel T, yang melisiskan sel yang terinfeksi dan memproduksi sitokin (Rothman, 2011).

Peningkatan ekspresi CD4<sup>+</sup> sel T pada kultur PBMC yang diinokulasi 5µg ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) sesuai dengan hasil penelitian Lutfi dkk. (2012) yang menyimpulkan infusa daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) dosis 5µg meningkatkan ekspresi CD4<sup>+</sup> pada kultur PBMC. Tanaman obat-obatan memiliki target modulasi seluler dan molekuler melalui sel APC (misalnya sel dendritik), limfosit T dan limfosit B. Respon imun fisiologis dimulai dengan *antigen presenting cell* (APC). APC yang bertanggung jawab untuk aktivasi sel T *helper*, T *killer* sel dan sel B adalah sel dendritik (DC). Jalur peptida dari tanaman yang termasuk antigen eksogen menstimulasi sel dendritik mengaktivasi sel T melalui ekspresi MHC II pada sel dendritik yang akan mengaktivasi CD4<sup>+</sup> (Patel, 2012).

Nilai prosentase ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> pada kontrol dan semua perlakuan meskipun berbeda secara statistik tetapi masih masuk dalam rentang nilai normal, yaitu 31 – 60%, hal ini menunjukkan ekstrak daun Jawer kotok dosis 5µg dan 10µg serta ekstrak meniran dosis 5µg tidak menimbulkan efek samping hiperimun (reaksi imunitas yang berlebihan) (Retnowati, 2013).

## **6.2 Potensi Imunomodulasi Ekstrak Jawer Kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) Terhadap Sekresi IFN $\gamma$ .**

Sel T CD4<sup>+</sup> yang diaktifkan akan berdiferensiasi tergantung jenis stimulan (sitokin) yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Sitokin Th1 yang paling penting dihasilkan dalam fase efektor adalah IFN $\gamma$ . Aktivitas fagosit akan dipacu IFN $\gamma$  dalam membunuh sel-sel mikroba dengan meningkatkan kerusakan intraseluler pada mikroba. Fungsi subjek Th1 efektor adalah sebagai pertahanan

infeksi di mana proses fagositosis sangat diperlukan. Fungsi IFN $\gamma$  sebagai pengatur leukosit dalam pertumbuhan, maturasi dan diferensiasi sel-sel imun, mengaktivasi makrofag, sel NK dan sel B dalam memproduksi imunoglobulin. (Schroeder *et al.*, 2004).

Hasil analisis data sekresi IFN $\gamma$  menunjukkan P0, P1, P2 dan P4 mensekresikan lebih tinggi dibanding kontrol tetapi lebih rendah dibanding P3. Perlakuan P0 dengan inokulasi ekstrak 5 $\mu$ g ekstrak Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) mensekresikan lebih tinggi dibanding kontrol yang ditambahkan DMSO 0,01%. Sekresi IFN $\gamma$  pada P0 lebih tinggi dari kontrol dikarenakan kandungan flavanoid ekstrak 5 $\mu$ g ekstrak Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) mampu menstimulasi sekresi IFN $\gamma$ . Kandungan flavanoid dapat meningkatkan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur sel makrofag dan sel timosit (Jain *et al.*, 2008; Oka, 2000).

P1, P2 dan P4 adalah kelompok perlakuan yang diinfeksi virus *Dengue* tipe-2 menunjukkan hasil sekresi IFN $\gamma$  yang lebih tinggi dibanding kontrol yang tidak diinfeksi. Sekresi IFN $\gamma$  pada pasien *dengue fever* lebih tinggi dari pada PBMC manusia sehat sesuai dengan hasil penelitian Azeredo *et al.*, (2001). Berdasarkan aktivasi sel T CD4<sup>+</sup> dan peningkatan sekresi IFN $\gamma$  dibanding kontrol mengindikasikan stimulasi virus *Dengue* tipe-2 strain ITD Unair dengan titer 1,1 x 10<sup>8</sup> TCID50/ml dengan dosis 5 $\mu$ l mampu memodulasi kultur sel PBMC dengan jumlah sel 1 x 10<sup>5</sup> PBMC/ml. Virus *Dengue* tipe-2 dengan titer 1,38 x 10<sup>8</sup> TCID50/ml dengan dosis 30 $\mu$ l mampu menginfeksi kultur sel monosit dengan jumlah 1 x 10<sup>6</sup> sel monosit/ml (Reis *et al.*, 2008).

Perlakuan P2 (5µg ekstrak *Phyllanthus niruri*) dan P4 (5µg ekstrak *Plecthranthus scutellaroides*) tidak berbeda dengan perlakuan P1 (infeksi virus *Dengue* tipe-2 dengan DMSO 0,01%) dalam mensekresikan IFN $\gamma$  dikarenakan kompetisi antara senyawa aktif ekstrak tanaman dengan antigen virus dalam menginduksi sel APC yang sama (sel dendritik) sehingga efek ekstrak dengan dosis 5µg tidak cukup memodulasi sekresi IFN $\gamma$  paska infeksi virus. (Souza *et al.*, 2005; Patel, 2012).

Sekresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC diinfeksi virus *Dengue* yang diinokulasi 10µg ekstrak *Plecthranthus scutellaroides* menunjukkan hasil yang paling tinggi dan berbeda sangat nyata dengan kontrol mengindikasikan potensi imunostimulasi sitokin. Kadar IFN $\gamma$  pada perlakuan P3 yang lebih tinggi dari P1(kultur PBMC yang diinfeksi virus) tidak berkaitan dengan *cytokine storm* seperti TNF $\alpha$  yang berperan dalam peningkatan patogenesis penyakit *dengue hemorrhagic fever*, tetapi potensi kandungan ekstrak tanaman yang bersifat antiviral. (Nguyen *et al.*, 2004; Chaturvedi *and* Kumaria, 2006; Jain *et al.*, 2008).

### **6.3 Potensi Imunostimulator Ekstrak Jawer Kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) Terhadap Ekspresi Sel T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> dan Sekresi IFN $\gamma$**

Secara klinis, imunomodulator dapat digolongkan menjadi tiga yaitu : 1) *immunoadjuvants* adalah imunomodulator yang digunakan untuk meningkatkan efektivitas vaksin dan merupakan stimulan imun spesifik. 2) imunosupresan adalah imunomodulator yang menekan respon imun, digunakan secara bersamaan dalam kombinasi obat untuk meminimalisir penolakan pada transplantasi organ dan mengobati penyakit autoimun. 3) Imunostimulan adalah imunomodulator

yang digambarkan sebagai perangkat tambahan untuk resistensi tubuh terhadap infeksi, bertindak melalui respon imun bawaan serta adaptif. Peran yang diharapkan pada individu sehat adalah sebagai profilaksis dan promotor agen, yaitu *immunopotentiators*, dengan meningkatkan tingkat dasar respon imun, sedangkan pada individu dengan gangguan respon imun, diharapkan untuk bertindak sebagai agen imunoterapeutik (Patel, 2012).

Berdasarkan analisis data dapat disimpulkan ekstrak daun Jawer kotok dosis 5 $\mu$ g memiliki potensi immunodulasi dalam meningkatkan ekspresi CD4<sup>+</sup> sel T, sekresi IFN $\gamma$  tetapi tidak mempengaruhi ekspresi CD3<sup>+</sup> sel T pada kultur PBMC yang tidak diinfeksi (normal). Ekspresi sel T CD3<sup>+</sup> meskipun tidak menunjukkan respon peningkatan tetapi masih dalam kategori normal, presentase subset CD3<sup>+</sup> pada laki-laki 58-88% dan rata-rata 72% dapat diamati pada tabel 5.1. Selaras dengan hasil penelitian herbal yang lain secara *in vivo* pada pemberian sari Jahe pada manusia selama 30 hari meskipun menunjukkan penurunan ekspresi CD3<sup>+</sup> sebanyak rata-rata 0,27 persen yang dinyatakan masih dalam selang normal tetapi dapat meningkatkan aktivitas sel T (Nurrahman, 1998). Hal ini membuktikan ekstrak daun Jawer kotok memiliki potensi imunomodulator kategori imunostimulator yang dapat bertindak sebagai *immunopotentiators*.

Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) dosis 5 $\mu$ g tidak meningkatkan ekspresi CD3<sup>+</sup> sel T, sekresi IFN $\gamma$  menurunkan ekspresi CD4<sup>+</sup> sel T pada kultur PBMC yang diinfeksi virus *Dengue* tipe-2 strain ITD Unair. Dosis 5 $\mu$ g ekstrak Jawer kotok belum mencukupi untuk menstimulasi sel T CD3<sup>+</sup> dan

CD4<sup>+</sup>, menurut Widiyanto (1987), yang paling menentukan potensi senyawa sebagai imunomodulator adalah *timing* (waktu dan lama pemberian) dan dosis.

Penelitian tanaman Jawer kotok sebelumnya telah dilakukan tentang potensinya sebagai antiinflamasi, antibakteri dan imunomodulator terhadap stimulasi bakteri. Potensi imunomodulator daun Jawer kotok yang pernah diteliti tentang potensi kapasitas dan aktivitas makrofag dalam memfagosit bakteri *Staphylococcus aureus* pada mencit *in vivo* dan ekspresi sel T CD4 dan ekspresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC normal, belum pernah dilaporkan penelitian tentang potensi imunomodulator ekstrak daun Jawer kotok pasca infeksi virus *Dengue* tipe-2 pada kultur PBMC *in vitro* (Moektiwardoyo dkk., 2011; Nugroho 2011; Lutfi, dkk., 2012). Hasil analisis statistik penelitian ini menyimpulkan Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) dosis 10 $\mu$ g memiliki potensi imunomodulasi dalam meningkatkan sekresi IFN $\gamma$  tetapi tidak mempengaruhi ekspresi sel T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> pada kultur PBMC yang diinfeksi virus *Dengue* tipe-2 strain ITD Unair. Peran IFN $\gamma$  sebagai faktor aktivasi makrofag adalah meningkatkan kemampuan makrofag dalam membunuh virus dan mikroba intraseluler (Diemer *et al.*, 1998). Berdasarkan hal tersebut di atas potensi imunomodulator ekstrak daun Jawer kotok 10 $\mu$ g pada kultur PBMC pasca infeksi virus *Dengue* tipe-2 ITD Unair adalah sebagai imunostimulator (Patel, 2012).



## **BAB 7**

# **KESIMPULAN**

## BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan :

- 1) Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) dosis 5 $\mu$ g memiliki potensi imunomodulator dalam meningkatkan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur PBMC normal.
- 2) Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) dosis 5 $\mu$ g tidak mempengaruhi ekspresi sel T CD3<sup>+</sup> dan sekresi IFN $\gamma$  tetapi menurunkan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup> pada kultur PBMC yang diinfeksi virus *Dengue* tipe-2 strain ITD Unair.
- 3) Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) dosis 10 $\mu$ g memiliki potensi imunomodulator dalam meningkatkan sekresi IFN $\gamma$  tetapi tidak mempengaruhi ekspresi sel T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> pada kultur PBMC yang diinfeksi virus *Dengue* tipe-2 strain ITD Unair.

### 7.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini disarankan : Dosis 5 $\mu$ g Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) untuk meningkatkan ekspresi CD4<sup>+</sup> sel T dan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur sel PBMC normal. Dosis 10 $\mu$ g Ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) untuk meningkatkan sekresi IFN $\gamma$  pada kultur sel PBMC yang diinfeksi virus *Dengue* tipe-2 strain ITD Unair. Penelitian lebih lanjut potensi imuno ajuvan, antiviral dan imunoterapi ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthranthus scutellaroides*) secara *in vitro* maupun *in vivo*.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., K.M. Murphy and A. Sher. 1996. Functional Diversity Of Helper T Lymphocytes. *Nature*. 383: 787–793.
- Abbas, A.K. and Litchman A.K. 2006. *Celullar and Moloculer Immunology*. Fith Edition. Saunders.
- Achmad, H. dan C.S. Wahono. 2001. Pengaruh Pemberian Ekstrak Psidium Guajava Terhadap Jumlah Trombosit Pada Penderita Demam Berdarah Dengue di Bangsal Rawat Inap penyakit Dalam RSUP. Dr. Syaiful Anwar Malang, *Majalah Kedokteran Unibraw*, Vol. 17 (1) : 1-3.
- Anderson, W.L. 1999. Introduction to the Immune System: Innate and Acquired Immunity. Dalam: *Immunology*. Fence Creek Publishing. Madison. 7-22.
- Anderson, K.P., E.H. Fennie and T. Yilmo. 1989. Enhancement Of A Secondary Antibody Response To Vesicular Stomatitis Virus G Protein By Ifny Treatment At Primary Immunisation *J. Immun.* 140:3599 – 3604.
- Ariyanty, T.R., R.I. Fazrina dan Darmono. 2007. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Iler (*Coleus artropurpureus* L. Benth) Terhadap Infeksi *Salmonella enteridis* Pada Mencit (*Mus musculus*). Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Azeredo, E.L., S.M. Zagne, M.A., Santiago, A.S. Gouvea, A.A. Santana, Neves, P.C. Souza, R.M. Nogueira, M.P. Miagostovich and C.F. Kubelka. 2001. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 204:494–507
- Baratawidjaya, K. 2006. Penggunaan Herbal Medisin Untuk Immunostimulator Dan Kemopreventif. Bagian Ilmu penyakit Dalam FKUI. Jakarta.
- Cao, M.O., A. Sasaki, Yamada and J. Imanishi. 1992. Enhancement of The Protective Effect of Inactivated Influenza Virus Vaccine by Cytokines. *Vaccine*. 10: 238–242.
- Chase, A.J., A.M. Freddy and L.M.J. Jorge. 2011. Impairment of CD4 T Cell Polarization by Dengue Virus–Infected Dendritic Cells. *The Journal of Infectious Diseases*. 203:1763–74.

- Chaturverdi, A. and R. Kumaria. 2006. Circulating levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  in patients with dengue and dengue hemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J. Med. Res.* 123 : 25-30.
- Chaturvedi, U.C., R. Agarwal, E.A. Elbishbishi and A.S. Mustafa. 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28 : 183-188.
- Chen, Z. and O'shea J.J. 2007. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res.* Humana Press Inc.
- Dewoto, H.R. 2007. Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 57 (7).
- Diemer, I.H., P. Quere, M. Naciri and D.T. Bout. 1998. Inhibition of *Eimeria tenella* Development In Vitro Mediated by Chicken Macrophages and Fibroblast Treated With Chicken Cell Supernatant With Ifn-  $\gamma$  Activity. *Avian Dis.* 42: 239 - 247.
- Djauzi, S. 2003. Perkembangan Imunomodulator. Simposium Peranan Echinacea sebagai imunomodulator dalam Infeksi Virus dan Bakteri.
- Djayakusumah, T.S. 2010. Peranan Imunomodulator Dalam Pengobatan Infeksi Menular Seksual. PKB "New Perspective of Sexually Transmitted Infection Problems" Surabaya 7-8 Agustus.
- Dharma, R., S.R. Hadinegoro dan I. Priatni. 2006. Disfungsi Endotel Pada Demam Berdarah Dengue. *Makara, Kesehatan.* 10 (1) : 17-23.
- Fransworth, N.R., A.D. Kinghorn, D.D. Soeharto and D.P. Waller. 1985. Siberian Ginseng (*Eleutheracoccus scenticosus*): current status as an adaptogen: Pp 155-215. In H. Wagner, H. Hikino and N.R. Fransworth(eds) *Economic and Medicinal Plant Research Vol I* Academic Press, Orlando Florida.
- Gabius, H.J. 2003. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: Case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochemie.* 83: 659-666.
- Ganda, I.J. 2010. Nilai Prognostik Tumor Necrosis Factor Alpha Demam Berdarah Dengue pada Anak. *Sari Pediatri*, 12 (4).

- Ganju, L., Y. Padwad, R. Singh, R. Karan, S. Chanda, M.K. Chopra, P. Bhatnagar, R. Kashyap and R.C. Sawhney. 2005. Antiinflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *Int. Immunopharmacol.* 5 : 1675–1684.
- Gazzinelli, R.T., S. Hieny and A. Sher. 1993. Il-12 Is Required For The T-Lymphocyte-Independent Induction Of Interferon Gamma By An Intracellular Parasites And Induces Resistance In T-Cell-Deficient Hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 6115 – 6119.
- Guler, M.L., J.D. Gorham And K.M. Murphy. 1996. Genetic Susceptibility To Leishmania: Il-12 Responsiveness In Th1 Cell Development. *Science.* 271: 984 – 987.
- Gurugama, P., P. Garg, J. Pereira, A. Wijewickkrama and S.L. Seneviratne. 2010. Dengue Viral Infections. *Indian Journal of Dermatology.* 55(1): 66-78.
- Guzman, M.G. and G. Kouri. 2002. *Dengue : an update.* *Lancet, Infect Dis.* 2:33–42
- Hamidah. 2013. Identifikasi tanaman *Plecthrantus scutellaroides* (L). Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Handayani, K. 2004. Inventarisasi Jenis-Jenis Herba di Kawasan Hutan Tangkahan Taman Nasional Gunung Leuser Kabupaten Langkat. Skripsi Sarjana Biologi. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Heath, A.W., M.E. Devey, I.M. Brown, C.E. Richards and J.H.L. Playfair. 1989. Interferon-Gamma As An Adjuvant In Immunocompromised Mice. *Immunology.* 67: 520 – 524.
- Hollman, P.C.H., M.G.L. Hertog and M.B. Katan. 1996. Analysis and Health Effects of Flavonoids. *Food Chemistry.* 57 (1) : 43-46.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia And K.M. Murphy. 1993. Development Of Th1 Cd4+ T Cells Through Il-12 Produced By Listeria-Induced Macrophages. *Science.* 260 : 547 – 549.
- Huang, C.F., S.S. Lin, P.H. Liao, and C.C. Yang. 2008. The Immunopharmaceutical Effects and Mechanisms of Herb Medicine. *The Chinese Society of Immunology.* 5 (1).
- Iwo, M.I. 2006. *Imunomodulator.* Sekolah Farmasi ITB. Bandung.



- Jain, M., L. Ganjua, A. Katiyal, Y. Padwad, K.P. Mishra, S. Chanda, D. Karan, K.M.S. Yogendra and R.C. Sawhney. 2008. Effect of Hippophae rhamnoides leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. Published by Elsevier GmbH. *Phytomedicine*. 15 : 793–799
- Karnen, G.B., S. Djauzi, T.Y. Aditama, W. Heru dan S. Cartelieri. 2003. Peranan Echinacea(EFLA<sup>®</sup>894) Sebagai Immunomodulator Dalam Infeksi Virus dan Bakteri. *Medika*. 6 (13).
- Kinho, J., D.I.D. Arini, J. Halawane, L. Nurani, Halidah, Y. Kafiar dan M.C. Karundeng. 2011. Tumbuhan Obat Tradisional Di Sulawesi Utara Jilid II. Balai Penelitian Kehutanan Manado. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Kementrian Kehutanan.
- Kresno, S.B. 1996. *Imunologi diagnosis dan prosedur laboratorium*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kurane, I., B.. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. Meager, J. Janus, F.A. Ennis. 1991. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin. Invest.* 88:1473–1480
- Kurane, I., T. Matsutani, R. Suzuki, T. Takasaki, S. Kalayanarooj, S. Green, A.L. Rothman and F.A. Ennis. 2011. T-cell Responses to Dengue Virus in Humans. *Tropical Medicine and Health*. 39 (4) : pp. 45-51.
- Khanduja, K.L., P.K. Avti, S. Kumar, N. Mittal and K.K. Sohi. 2006. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: A Bcl-2 independent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1760 : 283-289.
- Lam, H.Y., S.K. Yeap, N.B. Alitheen, W.Y. Ho and A.R. Omar. 2010. Understand the role of natural killer. *Am. J. Immunol.* 6 : 54-61.
- Liew, F.Y. And F.E.G. Cox. 1991. Nonspecific Defence Mechanism: The Role Of Nitric Oxide. *Parasitology Today* 7: A17 – A21.
- Lowenthal, J.W., B. Lambrecht, T.P. Van Den Berg, M.E. Andrew, A.D.G. Strom And A.G.D. Bean. 2000. Avian Cytokines-The Natural Approach To Therapeutics. *Developmental And Comparative Immunology*. 24:355 – 365.

- Lutfi, U.M., A. Erina, N. Izzah, R.A. Pradikta, F. Kusumaning, A. Jayawardhana, D. Chrismanto, A.B. Arafat, A.D. Yanti, E. Chumaidah, B. Julianto, S.N.R. A. Rochmah, F.A. Rantam. 2012. Potency of Immunomodulating Activities Infusa Leaf *Plectranthus scutellaroides* on Human PBMCs cells in vitro. Ppt. Strategy To Manage Bio-Eco-Health System For Stabilizing Animal Health And Productivity To Support Public Health. Surabaya.
- Marcus, P.I., L. Van Der Heide and M.J. Sekellick. 1999. Chicken interferon caction and avian viruses. I. Oral administration of interferon-gamma ameliorates Newcastle disease. *J. Interferon Cytokine Res.* 19 : 881-885.
- Maryati dan E.M. Sutrisna. 2007. Potensi Sitotoksik Tanaman Ceplukan (*Physalis Angulata* L) Terhadap Sel Hela Cytotoxic Effects Of *Physallis Angulata* Plant On Hela Cell Line. *Pharmacon.* 8 (1) : 1-6.
- Masihi, K.N. and H. Schäfer. 2011. Overview of Biologic Response Modifiers in Infectious Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 25 (4) : 723-731.
- Masruroh, E. 2005. Pengaruh Infus Daun Iler (*Coleus Scutellarioides* (L. Benth.) Terhadap Zona Hambat *Candida Albicans*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Malang.
- Mori, M.,I. Kurane, Janus and F.A. Ennis. 1997. Cytokine Production by Dengue Virus Antigen Responsive Human T Lymphocyte In Vitro Examined Using a Double Immunocytochemical Technique. *Journal Of Leucocyte Biology.* 61 (3).
- Moektiwardoyo, M., J. Levita, S.P. Sidiq, K. Ahmad, R. Mustarichie, A .Subarnas and Supriyatna. 2011. The determination of quercetin in *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. leaves extract and its *In Silico* Study on Histamine H4 Receptor. *Majalah Farmasi Indonesia.* 22(3).
- Moelyono. 2006. Mengandung Flavonoid, Daun Jawer Kotok Bisa Jadi Obat Anti-Inflamasi. [www.unpad.ac.id](http://www.unpad.ac.id).
- Nguyen, T.H., H.Y. Lei, T.L. Nguyen, Y.S. Lin, K.J. Huang and B.L. Lee. 2004. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J. Infect. Dis.* 189 : 221-232.



- Nugroho, Y.A. 2012. Efek Pemberian Kombinasi Buah Sirih (*Piper Betle* L) Fruit, Daun Miyana (*Plectranthus Scutellarioides* (L.) R. Br.) Leaf, Madu Dan Kuning Telur Terhadap Peningkatan Aktivitas Dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag. *Media Litbang Kesehatan*. 22 (1).
- Nurrahman. 1998. Pengaruh konsumsi sari Jahe terhadap perlindungan limfosit dari stress oksidatif pada mahasiswa Pondok Pesantren Ulil Albaab di Bogor. [Thesis]. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Oka, S. (2000), Presence of B220 within thymocytes and its expression on the cell surface during apoptosis. *Immunology*. 100 : 417–423.
- Patel, K. 2012. A review on herbal immunoadjuvant. *Int. J. of Pharm. & Life Sci*. 3 (3) :1568-1576.
- Permanasari, E.D. 2008. Isolasi Flavonoid Dari Daun Jawer Kotok [*Coleus Scutellarioides* (L.) Benth. [ Skripsi]. S1 Departemen Farmasi ITB. Bandung.
- Purnama, A.A. 2008. Pengaruh Pemberian Echinacea Purpurea Terhadap Produksi Ifny Dan Indeks Apoptosis Sel Tumor Mencit Dengan Kanker Payudara Yang Mengalami Stres. [Thesis]. Magister Ilmu Biomedik Dan Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Bedah Universitas Diponegoro Semarang.
- Rantam, F.A. 2005. *Metode Immunology*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Reis, S.R.I.N. 2008. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *International Immunopharmacology*. elsevier.com. 8 :468–476.
- Rena, N.M.R.A., S. Utama dan T. Purwaty. 2009. Kelainan Hematologi Pada Demam Berdarah Dengue. *J Peny Dalam*, 10 (3).
- Retnowati, N. 2013. Nilai normal hasil pemeriksaan CD4<sup>+</sup>. Diagnostic center RSUD Dr Soetomo. Surabaya.
- Roitt, I.M. 1991. *Essential immunology*. Blackwell scientific publication. London.
- Rothman, A.L. 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storm. *Nature review Immunology*. 11: 532-543.

- Sastroasmoro, S., S. Soeroso, S. Djauzi, R. Mardiaty, N.W. Utami, M. Nasrul, M. Arcan dan N. Rahajeng. 2004. Pemberian terapi imunomodulator herbal. HTA Indonesia. 40 (40).
- Schroder, K., J.H. Paul, R. Timothy and A.H. David. 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75 : 163-189.
- Soegijanto, S., Azhali, M.S. Tumbelaka, A.R. Anggraini, R. Rufianti dan D.D. Sary. 2010. Uji Klinik Multisenter Sirup Ekstrak Daun Jambu Biji Pada Penderita Demam Berdarah Dengue. *Medicinus*. 23 (1).
- Soegijanto, S. 2006. Patogenesis dan perubahan patofisiologis infeksi virus Dengue. *Buletin Pediatrik*. 220.
- Soegiyono. 2010. Memahami Penelitian Kualitatif. Cetakan keenam. CV Alfabeta. Bandung.
- Soeroso. 2007. Sitokin. *Jurnal Oftalmologi Indonesia*. 5 (3).
- Souza, N., P.C. Azeredo, S.M. Zagne, R. Valls-de-Souza, S.R. Reis and D.I. Cerqueira. 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis* 5 :64.
- Spelman, K.M.S., J.J. Burns, N.D. Douglas Nichols, N. Winters, S. Ottersberg and M. Tenborg. 2006. Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines: A Review of Herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review Volume*. 12(2).
- Stanilove, S.A., Z.G. Dobрева, E.S. Slavov and L.D. Mitera. 2005. C3 binding glycoprotein from *Cuscuta Europea* induced different cytokine profiles from human PBMC compared to other plant and bacterial immunomodulators. *Int. Immunopharmacol*, 5: 723-734.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Cetakan Ke 2. (Alih bahasa, Sumantri. B). Penerbit PT. Gramedia, Jakarta.
- Suhirman, S. dan C. Winarti. 2007. Prospek dan Fungsi Tanaman Obat Sebagai Imunomodulator . Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.

- Sukara, E. 2000. Sumber daya alam hayati dan pencarian bahan baku obat (Bioprospekting). Prosiding Simposium Nasional II Tumbuhan Obat dan Aromatik. Puslitbang Biologi-LIPI, Bogor : 31-37.
- Suwarjiheryana.1987. Pemeriksaan pendahuluan kandungan kimia daun iler (*Coleus atropurpureus* Benth.). Abstrak. Penelitian Beberapa Tanaman Obat Di Beberapa Perguruan Tinggi Di Indonesia. Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta.1992.
- Swain, S.L., K.K. Mckinstry And T.M. Strutt. 2012. Expanding Roles For Cd4 T Cells In Immunity To Viruses. [www.Nature.Com/](http://www.Nature.Com/) Reviews/Immunol Macmillan Publishers Limited. All rights reserved. 12(2).
- Syamsuhidayat, S.S. dan J.R. Hutapea. 1991. Inventaris Tanaman Obat Indonesia Jilid I. Departemen Kesehatan Indonesia Jakarta. 168-169.
- Tenaya, I.W.M. 2011. Respon Seluler Dan Ekspresi *Cytokines* Yang Berperan Dalam Kesembuhan Dari Infeksi Virus Penyakit Jembrana Pada Sapi Bali. Buletin Veteriner, BBVet Denpasar. 13(12) : 79.
- Tizard, I.R. 2000. Immunology: An Introduction. 6th Ed. New York: Saunders College Publishing. pp. 98 – 161.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12 : A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu. Rev. Immunol. 13: 251 – 276.
- Tzianabos, A.O. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutics agents : structural aspects and biologic fungtion. Clinical Microbiology Review. 13(4): 523-533.
- Vlata, Z., F. Porichis, G. Tzanakakis, A. Tsatsakis and E. Krambovitis. 2006. A Study Of Zearalenone Cytotoxicity On Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Toxicol. Lett., 165: 274-281.
- Wagner, H. 1999. Immunomodulatory Agent From Plants. Berlin: Birkhauser 1999.
- Wagner, H. and M. Wiesenauer. 1995. Phytotherapie. Gustav Fischer:Stuttgart, Jena, New York

- Wahyuningsih, M.S.H. 2006. Deskriptif Penelitian Dasar *Herbal Medicine*. Bagian Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Wang, W.K., T.L. Sung, Y.C. Tsai, C.L. Kao, S.M. Chang and C.C. King. 2002. Detection of Dengue Virus Replication in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Dengue Virus Type 2-Infected Patients by a Reverse Transcription-Real-Time PCR Assay. *Journal Of Clinical Microbiology*, P. 4472-4478.
- Wiarth, C. 2006. *Medicinal Plants Of The Aisa-Pacific: Drugs For The Future*. World Scientific.
- Widianto, M.B. 1987. Imunomodulator. Jurusan Farmasi Institute Teknologi Bandung. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran*. 44-46.
- Wiedosari, E. 2007. Peranan Imunomodulator Alami (*Aloe vera*) dalam Sistem Imunitas Seluler dan Humoral. *Balai Besar Penelitian Veteriner*. Bogor. *Wartazoa* 17 : 4.
- Winkler, C., B. Wirleitner, K. Schroecksnadel, H. Schennach, E. Mur and D. Fuchs. 2005. In vitro effects of two extracts and two pure alkaloid preparations of *Uncaria tomentosa* on peripheral blood mononuclear cells. *Planta Med*. 205.
- Yeap, S.K., M.B.A. Rahman, N.B. Alitheen, W.Y. Ho, A.R. Omar, B.K. Beh and H. Ky. 2011. Evaluation of Immunomodulatory Effect Selection of the Correct Targets for Immunostimulation Study. *American Journal of Immunology* 7 (2): 17-23.
- Yuniarti, T. 2008. *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*. Cetakan Pertama MedPress. Yogyakarta.
- Zhu, J. and W.E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood journal*. Hematology library. Org. 112 : 5.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1 : Hasil Identifikasi Tanaman Jawer kotok.**



**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
DEPARTEMEN BIOLOGI**

Kampus C Mulyorejo Surabaya ( 60115) Telp. (031)5926804 Fax (031) 5926804  
Website: <http://biologi.fsaintek.unair.ac.id>

**Pengirim** : Ulva Mohtar Lutfi, drh. /NIM: 061144004  
Fakultas Kedokteran Hewan Unair

**Tanggal Sampel** : 4 Januari 2013

**Jenis Uji** : Identifikasi tanaman

Berdasarkan sample yang diterima, maka sample diidentifikasi sebagai berikut:

**Kerajaan** : Plantae  
**Divisi** : Magnoliophyta  
**Kelas** : Magnoliopsida  
**Ordo** : Solonales  
**Famili** : Lamiaceae  
**Genus** : *Plecthrantus*  
**Spesies** : *Plecthrantus scutellarioides* (L).

**Referensi:**  
Judd, Campbell, Kellogg and Stevens, 1999. *Plant Systematics*, Sinauer Associates, Inc, USA.

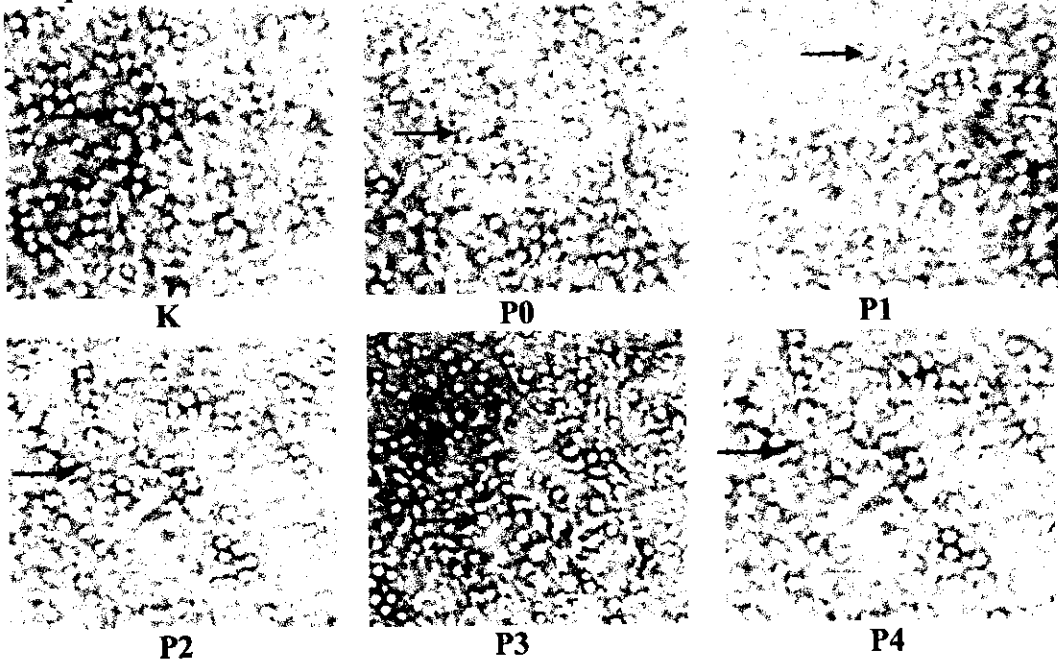
Simpson, Michael G. 2006. *Plant Systematics*, Elsevier Academic Press, USA.

Mengetahui,  
Ketua Departemen Biologi,  
Sekretaris,  
  
Ir. Nurhanyati, S.Si., M.Kes.  
NIP. :196711131994032001

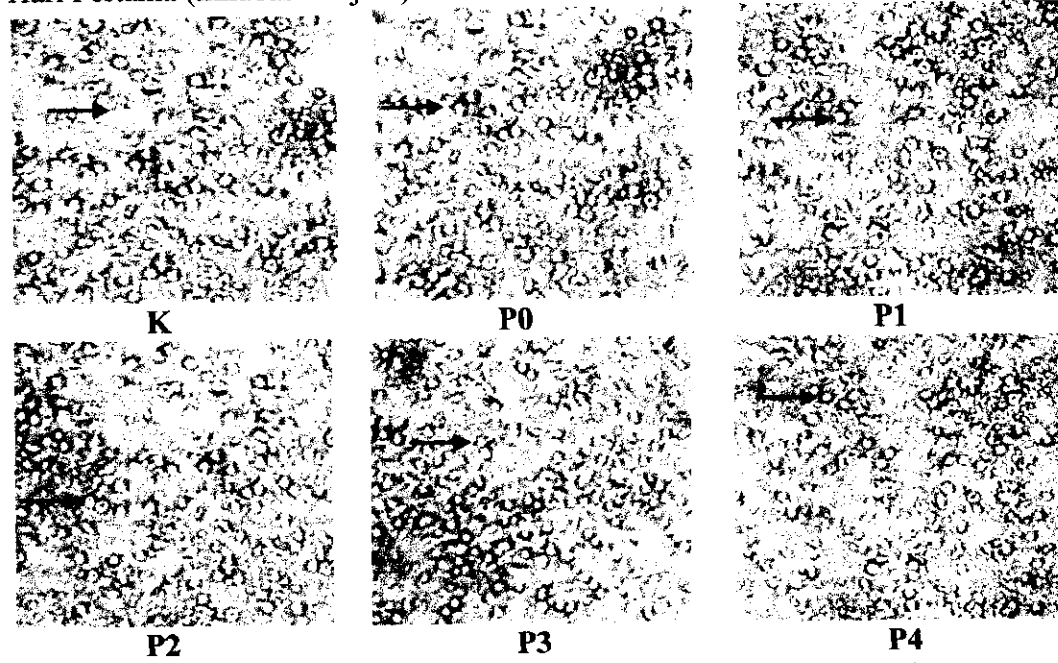
Surabaya , 12 Januari 2013  
Penyelia,

Dr. Hamidah  
NIP. :19630610 198701 2 001

**Lampiran 2 : Kultur Sel PBMC (perbesaran 400x), hari 0 (sebelum inkubasi).**



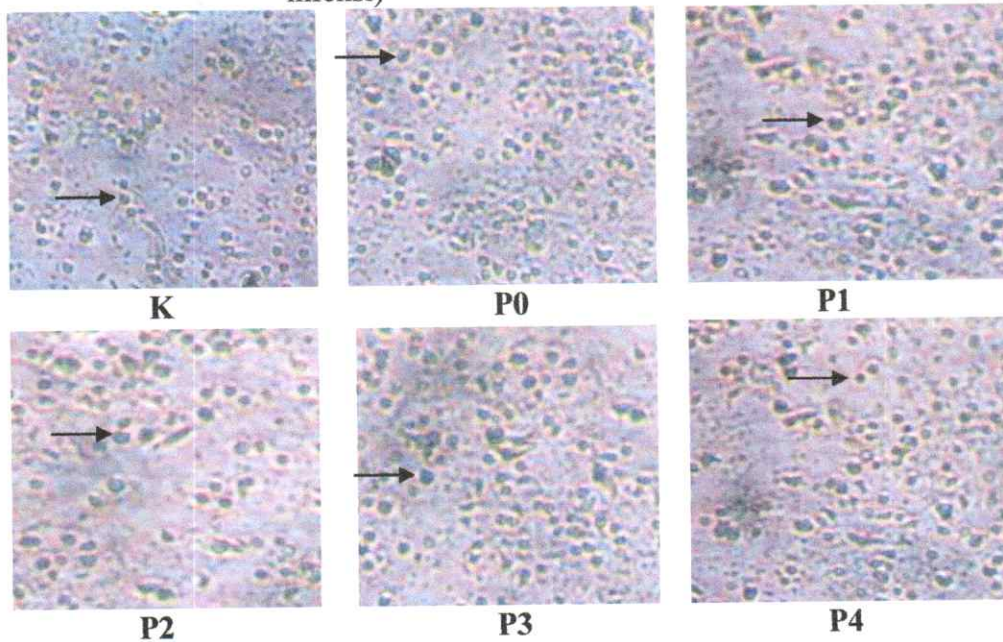
**Hari Pertama (inkubasi 24 jam)**



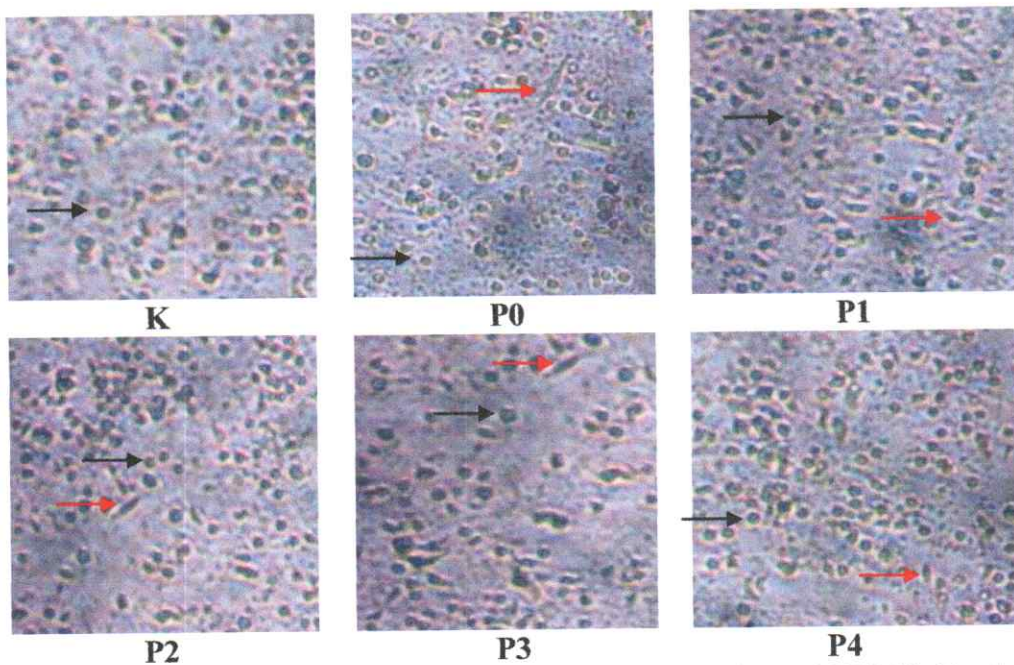
Keterangan : Tanda panah warna hitam (→) menunjukkan sel PBMC



Lanjutan Lampiran 2: Hari kedua (setelah inokulasi dan infeksi, 24 jam pasca infeksi)



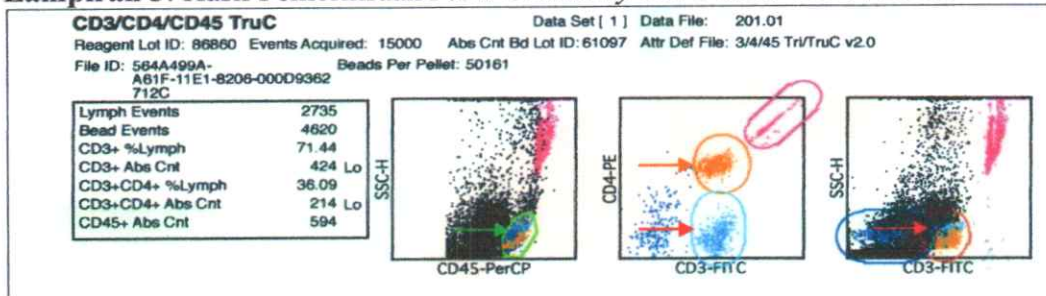
Hari ketiga (setelah inokulasi dan infeksi, 48 jam pasca infeksi)



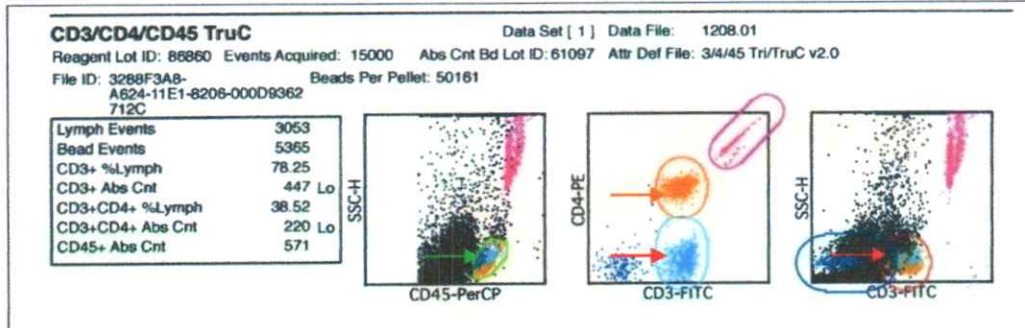
Keterangan : Tanda panah warna hitam (—>) menunjukkan sel PBMC. Tanda panah warna merah (—>) menunjukkan sel mesenkim.



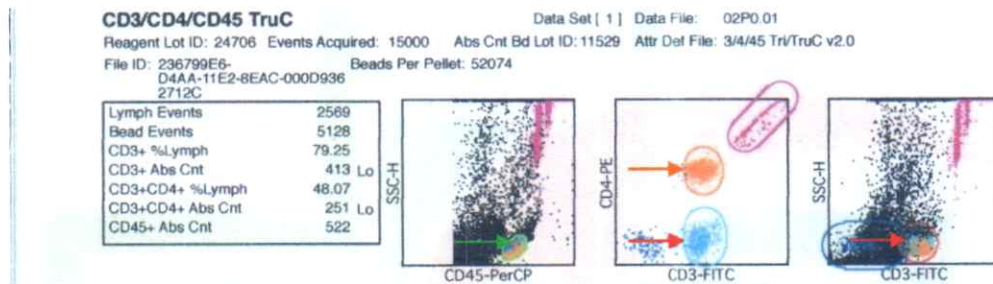
**Lampiran 3: Hasil Pemeriksaan *Flow Citometry* Sel T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>**



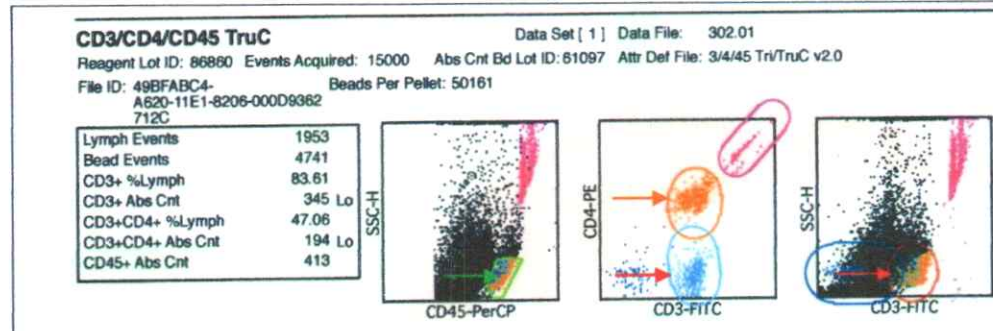
K1



K2



P0<sub>1</sub>



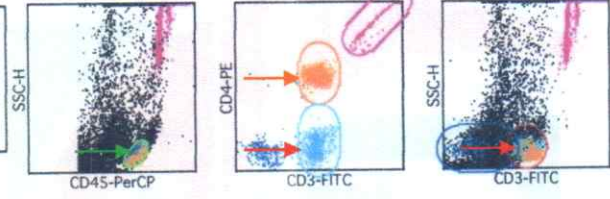
P02

Lanjutan Lampiran 3

**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 03P1.01  
 Reagent Lot ID: 24706 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 11529 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0  
 File ID: E115D822- D4AA-11E2-8EAC-000D936 Beads Per Pellet: 52074  
 2712C

Lymph Events	3895
Bead Events	3480
CD3+ %Lymph	81.13
CD3+ Abs Cnt	945
CD3+CD4+ %Lymph	52.02
CD3+CD4+ Abs Cnt	606
CD45+ Abs Cnt	1165

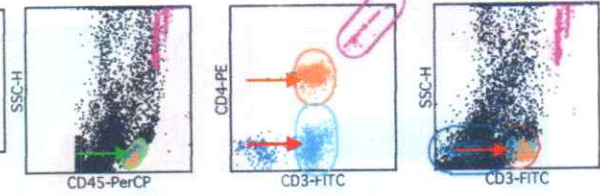


P1<sub>1</sub>

**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 01K.01  
 Reagent Lot ID: 24706 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 11529 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0  
 File ID: 768D39E2- D4A9-11E2-8EAC-000D936 Beads Per Pellet: 52074  
 2712C

Lymph Events	4328
Bead Events	3602
CD3+ %Lymph	82.26
CD3+ Abs Cnt	1029
CD3+CD4+ %Lymph	50.67
CD3+CD4+ Abs Cnt	634
CD45+ Abs Cnt	1251

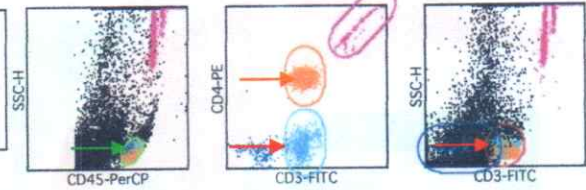


P1<sub>2</sub>

**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 04P2.01  
 Reagent Lot ID: 24706 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 11529 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0  
 File ID: 803CC3A2- D4AB-11E2-8EAC-000D936 Beads Per Pellet: 52074  
 2712C

Lymph Events	3424
Bead Events	3346
CD3+ %Lymph	82.59
CD3+ Abs Cnt	880
CD3+CD4+ %Lymph	52.16
CD3+CD4+ Abs Cnt	556
CD45+ Abs Cnt	1085

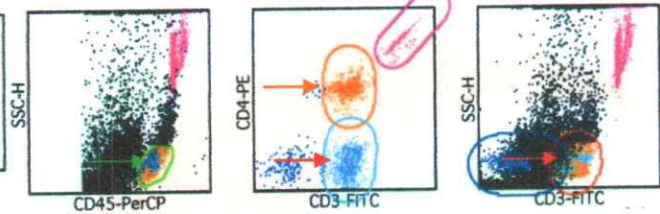


P2<sub>1</sub>

**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 705.01  
 Reagent Lot ID: 86860 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 61097 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0  
 File ID: 6F336273- A622-11E1-8206-000D9362 Beads Per Pellet: 50161  
 712C

Lymph Events	3227
Bead Events	4632
CD3+ %Lymph	80.23
CD3+ Abs Cnt	561 Lo
CD3+CD4+ %Lymph	50.11
CD3+CD4+ Abs Cnt	350 Lo
CD45+ Abs Cnt	699



P2<sub>2</sub>

Lanjutan Lampiran 3

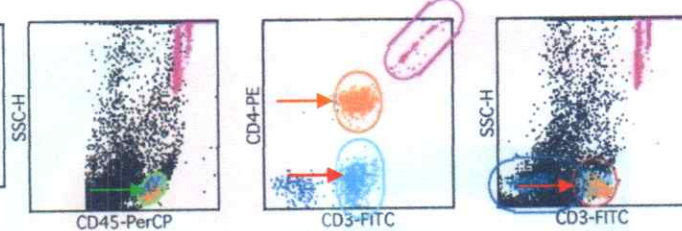
**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 05P3.01

Reagent Lot ID: 24706 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 11529 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0

File ID: 0CC62FCC-D4AC-11E2-8EAC-000D9362712C Beads Per Pellet: 52074

Lymph Events	3587
Bead Events	3320
CD3+ %Lymph	80.88
CD3+ Abs Cnt	910
CD3+CD4+ %Lymph	51.35
CD3+CD4+ Abs Cnt	578
CD45+ Abs Cnt	1125



P3<sub>1</sub>

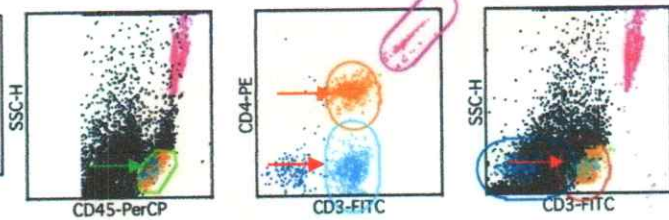
**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 806.01

Reagent Lot ID: 86860 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 61097 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0

File ID: 1F6CF298-A623-11E1-8206-000D9362712C Beads Per Pellet: 50161

Lymph Events	3000
Bead Events	4805
CD3+ %Lymph	82.07
CD3+ Abs Cnt	514 Lo
CD3+CD4+ %Lymph	51.20
CD3+CD4+ Abs Cnt	321 Lo
CD45+ Abs Cnt	626



P3<sub>2</sub>

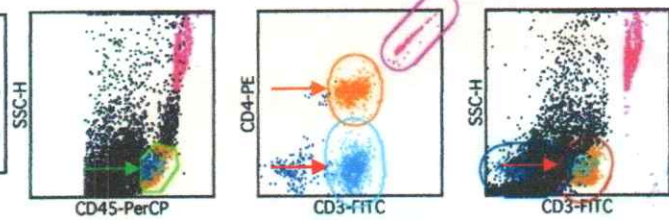
**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 504.01

Reagent Lot ID: 86860 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 61097 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0

File ID: BD4CA110-A621-11E1-8206-000D9362712C Beads Per Pellet: 50161

Lymph Events	3013
Bead Events	5765
CD3+ %Lymph	79.99
CD3+ Abs Cnt	419 Lo
CD3+CD4+ %Lymph	48.72
CD3+CD4+ Abs Cnt	255 Lo
CD45+ Abs Cnt	524



P4<sub>1</sub>

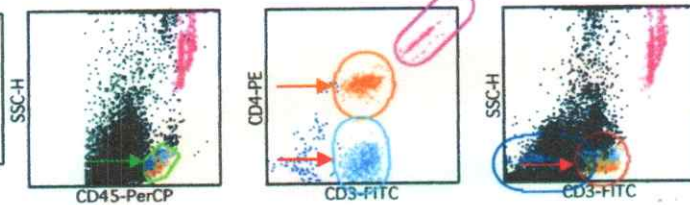
**CD3/CD4/CD45 TruC**

Data Set [ 1 ] Data File: 1107.01

Reagent Lot ID: 86860 Events Acquired: 15000 Abs Cnt Bd Lot ID: 61097 Attr Def File: 3/4/45 Tri/TruC v2.0

File ID: B00AA5FE-A623-11E1-8206-000D9362712C Beads Per Pellet: 50161

Lymph Events	2217
Bead Events	3769
CD3+ %Lymph	80.20
CD3+ Abs Cnt	473 Lo
CD3+CD4+ %Lymph	42.31
CD3+CD4+ Abs Cnt	250 Lo
CD45+ Abs Cnt	590

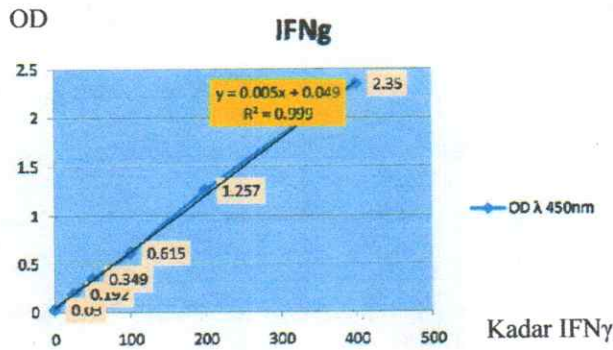


P4<sub>2</sub>

Keterangan gambar : → = sel T CD45<sup>+</sup> → = sel T CD4<sup>+</sup> → = sel T CD3<sup>+</sup>



**Lampiran 4 : Nilai *optimum density* (OD) dan kadar IFN $\gamma$  ELISA**



No.	Standart dan Sampel	OD $\lambda$ 450nm	Kadar IFN $\gamma$ (pg/ml)	Dilusi	Kadar IFN $\gamma$ Total (pg/ml)
1	Standart 1	0.03	0		N : 0-188.9
2	Standart 2	0.192	25		
3	Standart 3	0.349	50		
4	Standart 4	0.615	100		
5	Standart 5	1.257	200		
6	Standart 6	2.35	400		
7	(K1)	0.193	28.80	2	57.60
8	(K2)	0.211	32.40	2	64.80
9	(K3)	0.208	31.80	2	63.60
10	(K4)	0.241	38.40	2	76.80
11	(K5)	0.208	31.80	2	63.60
12	(PO.1)	0.252	40.70	2	81.40
13	(PO.2)	0.241	38.40	2	76.80
14	(PO.3)	0.177	25.60	2	51.20
15	(PO.4)	0.197	29.60	2	59.20
16	(PO.5)	0.271	44.40	2	88.80
17	(P1.1)	0.27	44.20	2	88.40
18	(P1.2)	0.28	46.20	2	92.40
19	(P1.3)	0.222	34.60	2	69.20
20	(P1.4)	0.239	38.00	2	76.00
21	(P1.5)	0.241	38.40	2	76.80
22	(P2.1)	0.227	35.60	2	71.20
23	(P2.2)	0.148	19.80	2	39.60
24	(P2.3)	0.274	45.00	2	90.00
25	(P2.4)	0.24	38.20	2	76.40
26	(P2.5)	0.277	45.60	2	91.20
27	(P3.1)	0.416	73.40	2	146.80
28	(P3.2)	0.254	41.00	2	82.00
29	(P3.3)	0.293	48.80	2	97.60
30	(P3.4)	0.297	49.60	2	99.20
31	(P3.5)	0.285	47.20	2	94.40
32	(P4.1)	0.253	40.80	2	81.60
33	(P4.2)	0.282	46.60	2	93.20
34	(P4.3)	0.364	63.00	2	126.00
35	(P4.4)	0.292	48.60	2	97.20
36	(P4.5)	0.24	38.20	2	76.40

Lampiran 5. Analisis Statistik CD4<sup>+</sup>

Descriptives

HASIL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	2	37.2600	1.78191	1.26000	21.2502	53.2698	36.00	38.52
2	2	47.5650	.71418	.50500	41.1484	53.9816	47.06	48.07
3	2	51.3450	.95459	.67500	42.7683	59.9217	50.67	52.02
4	2	51.1350	1.44957	1.02500	38.1111	64.1589	50.11	52.16
5	2	51.2750	.10607	.07500	50.3220	52.2280	51.20	51.35
6	2	45.5150	4.53255	3.20500	4.7916	86.2384	42.31	48.72
Total	12	47.3492	5.46958	1.57893	43.8740	50.8244	36.00	52.16

ANOVA

HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	301.827	5	60.365	13.290	.003
Within Groups	27.253	6	4.542		
Total	329.080	11			

Multiple comparison

(I) PERLAKU AN	(J) PERLAKU AN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-10.30500	2.13124	.021	-18.7870	-1.8230
	3	-14.08500	2.13124	.004	-22.5670	-5.6030
	4	-13.87500	2.13124	.005	-22.3570	-5.3930
	5	-14.01500	2.13124	.005	-22.4970	-5.5330
	6	-8.25500	2.13124	.056	-16.7370	.2270
2	1	10.30500	2.13124	.021	1.8230	18.7870
	3	-3.78000	2.13124	.539	-12.2620	4.7020
	4	-3.57000	2.13124	.588	-12.0520	4.9120
	5	-3.71000	2.13124	.555	-12.1920	4.7720
	6	2.05000	2.13124	.915	-6.4320	10.5320
3	1	14.08500	2.13124	.004	5.6030	22.5670
	2	3.78000	2.13124	.539	-4.7020	12.2620
	4	.21000	2.13124	1.000	-8.2720	8.6920
	5	.07000	2.13124	1.000	-8.4120	8.5520
	6	5.83000	2.13124	.197	-2.6520	14.3120
4	1	13.87500	2.13124	.005	5.3930	22.3570
	2	3.57000	2.13124	.588	-4.9120	12.0520
	3	-.21000	2.13124	1.000	-8.6920	8.2720
	5	-.14000	2.13124	1.000	-8.6220	8.3420
	6	5.62000	2.13124	.220	-2.8620	14.1020
5	1	14.01500	2.13124	.005	5.5330	22.4970
	2	3.71000	2.13124	.555	-4.7720	12.1920
	3	-.07000	2.13124	1.000	-8.5520	8.4120
	4	.14000	2.13124	1.000	-8.3420	8.6220
	6	5.76000	2.13124	.205	-2.7220	14.2420

6	1	8.25500	2.13124	.056	- .2270	16.7370
	2	-2.05000	2.13124	.915	-10.5320	6.4320
	3	-5.83000	2.13124	.197	-14.3120	2.6520
	4	-5.62000	2.13124	.220	-14.1020	2.8620
	5	-5.76000	2.13124	.205	-14.2420	2.7220

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**HASIL**

Tukey HSD

PERLAKU AN	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	2	37.2600	
6	2	45.5150	45.5150
2	2		47.5650
4	2		51.1350
5	2		51.2750
3	2		51.3450
Sig.		.056	.197

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lanjutan Lampiran 5: Analisis Statistik CD3<sup>+</sup>**

**Descriptives**

HASIL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	2	74.8450	4.81540	3.40500	31.5804	118.1096	71.44	78.25
2	2	81.4300	3.08299	2.18000	53.7305	109.1295	79.25	83.61
3	2	81.6950	.79903	.56500	74.5160	88.8740	81.13	82.26
4	2	81.4100	1.66877	1.18000	66.4167	96.4033	80.23	82.59
5	2	81.4750	.84146	.59500	73.9148	89.0352	80.88	82.07
6	2	80.0950	.14849	.10500	78.7808	81.4292	79.99	80.20
Total	12	80.1583	3.13158	.90401	78.1686	82.1480	71.44	83.61

**ANOVA**

HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	71.029	5	14.206	2.313	.168
Within Groups	36.846	6	6.141		
Total	107.875	11			

**Lanjutan Lampiran 5: Analisis Statistik Kadar IFNy**

**Descriptives**

HASIL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	65.2800	7.02794	3.14299	56.5537	74.0063	57.60	76.80
2	5	71.4000	15.61282	6.98226	52.0141	90.7859	51.20	88.40
3	5	80.5600	9.56075	4.27570	68.6888	92.4312	69.20	92.40
4	5	73.6200	21.02860	9.40428	47.5095	99.7305	39.30	91.20
5	5	104.0000	24.85961	11.11755	73.1327	134.8673	82.00	146.80
6	5	94.8800	19.32956	8.64444	70.8792	118.8808	76.40	126.00
Total	30	81.6233	21.04173	3.84168	73.7662	89.4804	39.30	146.80

**ANOVA**

HASIL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5566.298	5	1113.260	3.673	.013
Within Groups	7273.576	24	303.066		
Total	12839.874	29			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: HASIL

	(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1	2	-6.12000	11.01028	.993	-40.1630	27.9230
		3	-15.28000	11.01028	.734	-49.3230	18.7630
		4	-8.34000	11.01028	.972	-42.3830	25.7030
		5	-38.72000	11.01028	.019	-72.7630	-4.6770
		6	-29.60000	11.01028	.115	-63.6430	4.4430
		2	1	6.12000	11.01028	.993	-27.9230
	2	3	-8.16000	11.01028	.958	-43.2030	24.8830
		4	-2.22000	11.01028	1.000	-36.2630	31.8230
		5	-32.60000	11.01028	.066	-66.6430	1.4430
		6	-23.48000	11.01028	.305	-57.5230	10.5630
		3	1	15.28000	11.01028	.734	-18.7630
	3	2	9.16000	11.01028	.958	-24.8830	43.2030
		4	6.94000	11.01028	.988	-27.1030	40.9830
		5	-23.44000	11.01028	.307	-57.4830	10.6030
		6	-14.32000	11.01028	.782	-48.3630	19.7230
	4	1	8.34000	11.01028	.972	-25.7030	42.3830
		2	2.22000	11.01028	1.000	-31.8230	36.2630
		3	-6.94000	11.01028	.988	-40.9830	27.1030
		5	-30.38000	11.01028	.100	-64.4230	3.6630
		6	-21.26000	11.01028	.409	-55.3030	12.7830

5	1	38.72000	11.01028	.019	4.6770	72.7630
	2	32.60000	11.01028	.066	-1.4430	66.6430
	3	23.44000	11.01028	.307	-10.6030	57.4830
	4	30.38000	11.01028	.100	-3.6630	64.4230
	6	9.12000	11.01028	.959	-24.9230	43.1630
6	1	29.60000	11.01028	.115	-4.4430	63.6430
	2	23.48000	11.01028	.305	-10.5630	57.5230
	3	14.32000	11.01028	.782	-19.7230	48.3630
	4	21.26000	11.01028	.409	-12.7830	55.3030
	5	-9.12000	11.01028	.959	-43.1630	24.9230

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Hasil

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
Tukey	1	5	65.2800	
HSD <sup>a</sup>	2	5	71.4000	71.4000
	4	5	73.6200	73.6200
	3	5	80.5600	80.5600
	6	5	94.8800	94.8800
	5	5		104.0000
Sig.			.115	.066

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Keterangan : 1 = K : Kelompok kontrol, 2 = P0 : kontrol ekstrak Jawer kotok, 3 = P1 : Kelompok kontrol infeksi, 4 = P2 : Kelompok pembandingan dengan inokulasi 5µg ekstrak Meniran (*Phylantus niruri*), 5 = P3 : Kelompok perlakuan infeksi dengan inokulasi 10 µg ekstrak daun Jawer kotok(*Plecthrantus Scutelloroides*), 6 = P4 : Kelompok perlakuan infeksi dengan diinokulasi 5µg ekstrak daun Jawer kotok (*Plecthrantus scutelloroides*).