

SKRIPSI

RISKA INDRA HERAWATI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 70 %
DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava L.*) TERHADAP
INTERLEUKIN-3 PADA TIKUS**



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2003**

Lembar Pengesahan

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 70%
DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.) TERHADAP
INTERLEUKIN-3 PADA TIKUS**

SKRIPSI

**Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2004**

Oleh :

**Riska Indra Herawati
NIM: 050012280**

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

**Drs. Herra Studiawan, MS
NIP: 131 569 383**

**Idha Kusumawati, Ssi, Msi
NIP: 132 133 958**

KATA PENGANTAR

Tiada yang sempurna dalam keabadian, melainkan hanya Dzat Allah semata. Dengan izin Allah SWT, manusia dapat memuji sesamanya karena hakikat segala puji hanyalah milik Allah, Sang Pencipta Yang Maha Suci dan Maha Mulia.

Belum dikatakan bersyukur seseorang kepada Allah apabila belum bersyukur (berterima kasih) kepada sesamanya. Dengan izin Allah dan mengharap ridho Allah atas selesainya skripsi yang berjudul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 70 % DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.) TERHADAP INTERLEUKIN 3 PADA TIKUS”** penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Suprpto Ma'at, Ms dan Idha Kusumawati, Ssi, Msi selaku pimpinan proyek penelitian dari BPOM yang telah banyak memberikan bantuan dan dukungan baik moral maupun material sampai selesainya skripsi ini.
2. Drs. Herra Studiawan, Ms selaku dosen pembimbing utama yang telah dengan tulus ikhlas membimbing, memberikan nasehat dan saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Idha Kusumawati, Ssi, MSi selaku dosen pembimbing serta yang telah memberikan nasehat, dorongan semangat, dan bimbingan dengan penuh kesabaran dan tulus ikhlas kepada penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
4. Dr. Suprpto Ma'at, MS dan Dr. Wahjo Dyatmiko sebagai dosen penguji yang telah memberikan saran-saran demi kesempurnaan skripsi ini
5. Kepala Bagian Ilmu Bahan Alam dan ketua pengelola Laboratorium Hewan beserta seluruh karyawannya atas segala fasilitas yang disediakan dan bantuan yang diberikan selama pengerjaan skripsi ini
6. Ayah, Bunda, adik-adikku tercinta (anas,vonny) and all my family yang telah memberikan perhatian, cinta dan kasih sayang yang tak pernah putus, doa dan dorongan semangat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan

7. Teman-temanku seperjuangan “Jambu Biji” (fatma, yuni, pipin, upiek, nova, ulum, dewi, nunik, cita, dayu, didi, yuyun, vari, erni, nurul, miftah, dan teman-teman yang lain, maaf kalau tidak saya sebutkan disini) terima kasih atas semua bantuan dan kerja samanya selama pengerjaan skripsi ini
8. Teman-teman dikontrakan Dharmawangsa Barat No.1, terima kasih atas dukungan, kesabaran dan do'anya selama kebersamaan kita, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
9. Teman-teman seperjuangan mbak esti, wiwin, mbak ira, taza, rully terima kasih atas kesabaran dan do'anya sampai skripsi ini dapat terselesaikan.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu demi satu, yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Kebenaran dan kesempurnaan itu hanyalah milik Allah. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada pembaca dan memberikan sumbangan pada dunia ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang kefarmasian.

Surabaya, Agustus 2004

Penulis

RINGKASAN

Demam berdarah dengue (DBD) merupakan salah satu jenis penyakit menular yang disebabkan oleh virus dengue dan seringkali mengakibatkan kematian. Demam berdarah dengue masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia dan sampai saat ini obat demam berdarah belum ditemukan. Pengobatan demam berdarah dengue masih bersifat suportif yaitu dengan mengatasi kehilangan cairan plasma sebagai akibat peningkatan permeabilitas kapiler dan sebagai akibat perdarahan. Dari hasil studi klinis yang telah dilakukan oleh Harijono Achmad di RS Syaiful Anwar Malang terbukti ekstrak daun jambu biji dapat meningkatkan trombosit pada pasien DBD yang disertai trombositopenia.

Salah satu kandungan dalam daun jambu biji adalah kuersetin, kuersetin merupakan salah satu senyawa flavonoid yang dapat menghambat aktivitas enzim reverse transcriptase yang berarti dapat menghambat pertumbuhan virus berinti RNA. Di samping itu kuersetin juga berperan dalam sistem imun yakni sebagai immunomodulator dan proses sekresi sitokin.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terhadap peningkatan kadar interleukin 3 pada tikus sehingga nantinya dapat diketahui mekanisme peningkatan trombosit oleh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji. Interleukin 3 merupakan *colony stimulating factor* (CSF) yang dapat merangsang pertumbuhan dan maturasi sel progenitor dalam sumsum tulang untuk memproduksi sel-sel hematopoietik yaitu neutrofil, granulosit, makrofag, megakariosit dan eritrosit.

Ekstrak daun jambu biji diperoleh dengan cara mengekstraksi secara maserasi-perkolasi menggunakan pelarut etanol 70 %. Ekstrak yang didapat selanjutnya di uji kualitatif dengan metode KLT-Densitometri dengan cara membandingkan nilai Rf standar kuersetin dengan sampel dan membandingkan profil spektra dari standar kuersetin dan sampel. KLT dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform : aseton : asam formiat dengan perbandingan 150:33:25 dan di dapatkan nilai Rf standar kuersetin 0,42 dan Rf sampel 0,20; 0,40; 0,46 dan pelarut kloroform : aseton : asam formiat dengan perbandingan 9:1:1 dan di dapatkan nilai Rf standar kuersetin 0,20 dan Rf sampel 0,18.

Perhitungan dosis untuk sediaan peroral pada penelitian ini didasarkan pada studi klinis yang telah dilakukan oleh Dr. Suprpto Ma'at terhadap pasien demam berdarah dengue di RS Petrokimia Gresik. Pemberian ekstrak daun jambu biji dilakukan sebanyak 2 kapsul. Tiap kapsul mengandung 500 mg ekstrak. Tiap 500 mg ekstrak mengandung kuersetin sebanyak 2,65 mg. Jadi dosis yang dipakai adalah $2 \times 2,65 \text{ mg} = 5,31 \text{ mg}$ kuersetin per 50 kg berat badan manusia. Selanjutnya dosis ini dikonversikan pada tikus dengan nilai konversi 0,025 untuk tikus dengan berat badan 200 gram. Dari ekstrak etanol 70 % daun jambu biji yang dibuat yang akan digunakan sebagai bahan uji, mengandung kuersetin sebesar 2,46 %. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu tikus dengan $\frac{1}{2}$ x dosis uji, 1 x dosis uji, dan 2 x dosis uji.

Pengujian pengaruh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terhadap peningkatan interleukin 3 pada tikus dilakukan dengan memberikan secara peroral

sediaan uji pada hewan coba tikus selama enam hari. Pengukuran interleukin 3 dilakukan dengan metode ELISA. Prinsip pengukuran dengan metode ini adalah adanya reaksi antigen (Ag) sampel dan antibodi (Ab) berlabel yang telah dilekatkan pada sumuran (wells) dalam mikrotiter kit ELISA.

Dari hasil pengukuran dengan ELISA reader didapatkan nilai *optical density* (OD) interleukin 3 tikus. Rata-rata harga OD kelompok kontrol yaitu 0,094 dan kelompok uji dengan $\frac{1}{2}$ dosis uji 0,075, kelompok uji dengan 1 x dosis uji 0,080 dan kelompok uji dengan 2 x dosis uji 0,082. Selanjutnya harga OD kelompok kontrol dan kelompok uji ini dianalisis dengan anava satu arah (*one way anova*) dengan rancangan CRD pada derajat kepercayaan 95 %, diperoleh harga signifikan lebih kecil 0,05 yaitu 0,008. Hasil ini menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna antara satu pasang kelompok atau lebih. Untuk mengetahui secara pasti kelompok mana yang mempunyai perbedaan bermakna maka uji tersebut dilanjutkan dengan uji LSD.

Dari hasil analisis LSD dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok uji dosis 1, kelompok kontrol dengan kelompok uji dosis 2 dan kelompok kontrol dengan kelompok uji dosis 3. Dari hasil ini harga OD IL-3 kelompok uji dengan dosis $\frac{1}{2}$ x, 1x, dan 2x dosis uji lebih kecil dari harga OD IL-3 kelompok kontrol. Jadi dapat disimpulkan bahwa peningkatan trombosit oleh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji pada pasien DBD tidak melalui mekanisme peningkatan interleukin 3.

Dari hasil penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dapat meningkatkan GM-CSF dan IL-6 pada tikus, yang berarti meningkat pula jumlah trombositnya. Jadi, penurunan IL-3 oleh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji diperkirakan untuk mekanisme homeostasis dalam tubuh. Sebab apabila peningkatan GM-CSF dan IL-6 tidak diimbangi oleh penurunan IL-3 maka akan terjadi peningkatan trombosit yang berlebihan sehingga menyebabkan trombositosis.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka untuk penelitian lebih lanjut disarankan melakukan penelitian mengenai mekanisme lain ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dalam meningkatkan trombosit pada pasien DBD. Selain itu perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa apa yang berkhasiat dalam peningkatan trombosit pada pasien DBD oleh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji.

ABSTRACT

The Influence of 70% Ethanol Extract of *Psidium guajava*. L Leaf on The Rat Interleukin-3

The influence of 70 % ethanol extract of *Psidium guajava*. L leaf on the rat interleukin-3, was studied. The extract of *Psidium guajava*.L leaf is known can increased trombocyte in dengue hemorrhagic fever (DHF) patient. Interleukin-3 (IL-3) also known as multi CSF, stimulates pluripotent stem cells to produce all types of hematopoeitic cells such as trombocyte. Quercetin is a plant-derived polyphenolic flavonoid found in *Psidium guajava*.L leaf. Quercetin have antioxidant properties and can inhibit growth factors and cytokines. In this studied, quercetin is make for dose calculation. The dose of 70 % ethanol extract Psidii folium in this research is 2,724 mg /200 g BW on rat; 5,407 mg /200 g BW on rat and 10,813 mg /200 g BW on rat.

The influence of 70% ethanol extract of *Psidium guajava*. L leaf on the rat interleukin-3 was studied by ELISA assay. The sample was given orally during 6 days successively, and blood was taken by intracardial on seventh. Serum was taken to be measured with ELISA method to get the optical density (OD) of IL-3. A quantitative determination of antigen (interleukin-3) concentration is obtained by absorbance measurement of the colored reaction product using a spectrophotometric microwell reader (ELISA reader). The optical density (OD) of interleukin-3 samples is lower than interleukin-3 controls. The result showed that the ethanol 70 % extract of *Psidium guajava*.L doesn't have activity to increase interleukin-3. Therefore many research activities should be done in order to know another mecanism of trombopoeisis and the active compound.

Keywords : Extract, *Psidium guajava* L, Quercetin, Interleukin-3, ELISA.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman Jambu Biji.....	6
2.1.1 Sistematika Tatanama (Taksonomi).....	6
2.1.2 Morfologi Tanaman.....	6
2.1.3 Kandungan Tanaman	6
2.1.4 Khasiat Jambu Biji	7
2.1.5 Tinjauan Tentang Kuersetin	7
2.2 Tinjauan Tentang Ekstrak	8
2.3 Tinjauan Tentang Demam Berdarah	9
2.3.1 Definisi/Batasan Demam Berdarah.....	9
2.3.2 Etiologi/Penyebab Demam Berdarah Dengue.....	10
2.3.3 Epidemiologi Demam Berdarah Dengue.....	10
2.3.4 Patogenesis/Patofisiologis Demam Berdarah Dengue....	11
2.3.5 Kriteria Diagnosis Demam Berdarah Dengue.....	12
2.3.6 Pengobatan Demam Berdarah Dengue.....	13
2.4 Tinjauan Tentang Sistem Imun.....	13

2.4.1 Definisi/Batasan Sistem Imun.....	13
2.4.2 Pengelompokan Sistem Imun.....	13
2.4.3 Respon Imun Pada Demam Berdarah Dengue.....	14
2.5 Tinjauan Tentang Trombosit	14
2.6 Tinjauan Tentang Interleukin-3.....	20
2.7 Tinjauan Tentang ELISA	22
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	24
BAB IV METODE PENELITIAN	27
4.1 Bahan Penelitian	27
4.1.1 Bahan Uji.....	27
4.1.2 Hewan Coba.....	27
4.1.3 Bahan Kimia.....	27
4.2 Alat Penelitian.....	28
4.3 Skema Kerja.....	29
4.4 Prosedur Kerja dan Teknik Analisis Data	30
4.4.1 Pembuatan Ekstrak	30
4.4.2 Analisis Kualitatif.....	30
4.4.3 Pengukuran Kadar Kuersetin.....	31
4.4.4 Perlakuan Pada Hewan Coba.....	32
4.4.5 Pengambilan Serum Tikus.....	32
4.4.6 Pengukuran Optical Density (OD) IL-3	32
4.4.7 Analisis Data.....	36
BAB V HASIL PENELITIAN	37
5.1 Pembuatan Bahan Uji	37
5.2 Analisis Kualitatif	37
5.3 Penetapan Kadar Kuersetin	43
5.4 Perhitungan Dosis dan Pembuatan Sediaan Peoral	43
5.5 Pengukuran Optical Density (OD) Interleukin-3	44
BAB VI PEMBAHASAN	47
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	52
DAFTAR PUSTAKA	53

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel V.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 70 % Daun Jambu Biji	37
Tabel V.2 Hasil pengamatan kualitatif dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25).....	38
Tabel V.3 Hasil pengamatan kualitatif dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1).....	41
Tabel V.4 Kadar Kuersetin Dalam Ekstrak Etanol 70 % Daun Jambu Biji.....	43
Tabel V.5 Rekapitulasi Data Optical Density (OD) Interleukin-3 Sampel Serum Tikus dengan metode ELISA.....	45
Tabel V.6 Hasil Uji Anova satu Arah ($\alpha = 0,05$) dari Data Optical Density Interleukin-3	45
Tabel V.7 Hasil Uji LSD Antar Kelompok Dari Data Optical Density Interleukin-3	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Hal
2.1 Struktur Kimia Kuersetin	7
2.2 Mekanisme Terjadinya Trombositopenia Pada DBD	19
3.1 Kerangka Konseptual	26
4.1 Skema Kerja	29
4.2 Pengukuran IL-3 Dengan Metode ELISA.....	35
5.1 Hasil uji KLT dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25)	37
5.2 Profil Kromatogram Standar Kuersetin Pada λ 254 nm dengan Fase Gerak Kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25) yang diamati dengan alat Densitometer	38
5.3 Profil Kromatogram Sampel Pada λ 254 nm dengan Fase Gerak Kloroform : Aseton : Asam formiat (150:33:25) yang diamati dengan alat Densitometer	39
5.4 Profil Kromatogram Standar Kuersetin Pada λ 360 nm dengan Fase Gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25) yang diamati dengan alat Densitometer	39
5.5 Profil Kromatogram Sampel Pada λ 360 nm dengan Fase Gerak Kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25) yang diamati dengan alat Densitometer	40
5.6 Hasil Uji KLT dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1)	40
5.7 Profil Kromatogram Standar Kuersetin Pada λ 254 nm dengan Fase Gerak Kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1) yang diamati dengan alat Densitometer.....	41
5.8 Profil Kromatogram Sampel Pada λ 254 nm dengan Fase Gerak Kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1) yang diamati dengan alat Densitometer	42

5.9 Profil Kromatogram Standar Kuersetin Pada λ 360 dengan Fase Gerak Kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1) yang diamati dengan alat Densitometer	42
5.10 Profil Kromatogram Sampel Pada λ 360 nm dengan Fase Gerak Kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1) yang diamati dengan alat Densitometer	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1 Sertifikat Serbuk Simplisia daun Jambu Biji.....	56
Lampiran 2 Tabel Perbandingan Luas Permukaan Tubuh Beberapa Hewan Coba dan Manusia	57
Lampiran 3 Tabel Volume Maksimum dari Obat yang Diberikan Kepada Binatang Percobaan	58
Lampiran 4 Pembuatan Kurva Baku untuk Penetapan Kadar oleh Bahan Uji.....	59
Lampiran 5 Hasil Uji Anova Satu Arah (one way anova)	60

DAFTAR SINGKATAN

DBD	: Demam Berdarah Dengue
IL-3	: Interleukin-3
CSF	: Colony Stimulating Factor
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
HRP	: <i>Horseradish Peroksidase</i>
CMC-Na	: <i>Carboxy Methyl Cellulose-Na</i>
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
Anova	: <i>Analysis of Variance</i>
LSD	: <i>Least Significant Difference</i>
Rf	: <i>Retardation Factor</i>
Ag	: Antigen
Ab	: Antibodi

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) merupakan jenis penyakit yang telah tersebar luas di seluruh dunia, baik di daerah tropik maupun subtropik yang disebabkan oleh virus dengue. Epidemik dengue yang besar terjadi di Kuba pada tahun 1981, pada saat itu terdapat 344.203 kasus, 10.312 diantaranya termasuk derajat berat dan 158 penderita meninggal. Selain di Asia Tenggara dan kepulauan Karibia, dengue terdapat di daerah pasifik bagian barat, Australia, Afrika, Mediterania, dan Amerika (Purwantiningsih, 1999). Menurut sejarahnya, demam dengue di Indonesia mulai dilaporkan tahun 1779 oleh David Baylon di Batavia. Penyakit ini disebut penyakit demam lima hari yang dikenal dengan *knee trouble* atau *knokel kootz* (Novriani, 2002).

Sampai saat ini penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) masih menjadi masalah kesehatan masyarakat Indonesia. Hal ini didukung oleh data-data sebagai berikut: sejak ditemukannya kasus tersebut di Surabaya dan Jakarta pada tahun 1986, angka kejadian penyakit DBD meningkat dan menyebar ke seluruh daerah kabupaten di wilayah Republik Indonesia termasuk kabupaten yang berada di wilayah Propinsi Timor-timur, angka kematian kasus DBD masih tinggi, terutama penderita DBD yang datang terlambat dengan derajat IV, vektor penyakit DBD nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* masih banyak di jumpai di wilayah Indonesia, dan kemajuan teknologi dalam bidang transportasi disertai mobilitas penduduk yang cepat memudahkan penyebaran sumber penularan dari satu kota ke kota lain (Sugiyanto, S., 2004).

Gejala klinis DD/DBD yang ditemukan ikut menentukan derajat penyakitnya, antara lain demam tinggi 2-7 hari, manifestasi perdarahan (termasuk didalamnya uji terniquet positif, petekie, ekimosis, purpura), hepatomegali dan yang terakhir terjadi syok. Sedangkan diagnosis laboratoris

untuk menunjang gejala klinis ialah bila ditemukan trombositopenia $< 100.000/\text{mm}^3$, hemokonsentrasi lebih 20 % dari normal serta dijumpainya kardiomegali, hepatomegali, efusi perikard, dan efusi pleura pada pemeriksaan USG dan sinar rontgen (Novriani,2002).

Sampai saat ini obat demam berdarah belum ditemukan (www.infeksi.com/penyakit/penyakitdhfbd.html). Pengobatan demam berdarah dengue (DBD) saat ini masih bersifat suportif, yaitu mengatasi kehilangan cairan plasma sebagai akibat peningkatan permeabilitas kapiler dan sebagai akibat perdarahan (www.kompas.com/kompas-cetak/0403/11). Penatalaksanaan ini masih mengalami kendala (ketidakseragaman) khususnya mengenai pemberian cairan infus, transfusi trombosit, sehingga selain penatalaksanaan pasien kurang tepat dan tidak praktis, juga biayanya menjadi tinggi. Selain itu, pemberian kortikosteroid tidak terbukti bermakna pada DBD (Achmad H.,2001). Di Bangkok, Thailand, Badan Kesehatan Dunia (WHO) pernah berhasil membuat vaksin dengue divalen dan trivalen untuk mengatasi demam berdarah dengue. Namun sampai saat ini, vaksin tersebut belum dipasarkan di Indonesia (Achmad H., dkk, 2001).

Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) bekerja sama dengan Fakultas Kedokteran dan Fakultas Farmasi UNAIR mengembangkan ekstrak daun jambu biji untuk mengatasi penyakit DBD. Ekstrak daun jambu biji bisa menghambat pertumbuhan virus dengue penyebab demam berdarah dengue (DBD). Bahan ini juga mampu meningkatkan jumlah trombosit hingga $100.000/\text{mm}^3$ tanpa efek samping yang berarti, misalnya sembelit. Peningkatan tersebut diperkirakan dapat tercapai dalam tempo 8-48 jam setelah ekstrak daun jambu biji di konsumsi (www.kompas.com/kompas-cetak/0403/11/humaniora).

Achmad H. dkk (2001) telah melakukan penelitian pada pasien DBD di rumah sakit Syaiful Anwar dengan memberikan kapsul ekstrak jambu biji (*Psidium guajava.L*), hasilnya membuktikan bahwa pemberian kapsul yang mengandung 500 mg ekstrak *Psidium guajava.L* dengan dosis 3x2 kapsul selama 5 hari pada penderita DBD mempunyai hubungan yang bermakna dengan pencapaian jumlah trombosit $\geq 100.000/\text{mm}^3$ pada hari kelima terapi.

Trombositopenia (hitung trombosit $\leq 100.000/\text{mm}^3$) merupakan salah satu kriteria untuk mendiagnosis demam berdarah dengue (DBD), yang merupakan salah satu sebab perdarahan pada DBD disamping sebab-sebab lainnya seperti kerusakan kapiler, defek koagulasi dan disfungsi trombosit. Trombosit berasal dari sitoplasma megakariosit sumsum tulang dibawah pengaturan mediator humoral trombopoietin. Penelitian sumsum tulang pada pasien dengan DBD menunjukkan adanya defisit sumsum tulang yaitu tahap hiposelular pada hari ke 3-4 demam dan perubahan patologis sistem megakariosit. Dari penelitian dengan radioisotop dibuktikan adanya destruksi trombosit dalam sistem retikuloendotel yaitu dalam limpa dan hepar. Jadi pada pasien DBD terjadi penurunan produksi, meningkatnya destruksi dan pemakaian trombosit berlebih sehingga terjadi trombositopenia. Selain mengalami defisit secara kuantitatif, juga terdapat gangguan fungsi trombosit. Mekanisme yang menyebabkan terjadinya defisit kuantitatif dan disfungsi trombosit belum diketahui dengan jelas. Diduga karena kompleks imun (kompleks antigen dengue, immunoglobulin dan komplemen globulin) yang ditemukan pada permukaan trombosit (Sugianto D., Tatang K., dkk, 1994).

Sitokin merupakan sekelompok protein signal interseluler yang meregulasi tidak hanya imun lokal dan sistemik dan respon inflamasi tetapi juga penyembuhan luka, hematopoeisis (pembentukan dan pematangan sel darah) dan proses biologik yang lain (Oppenheim J.,J.,et.,al.,1991). CSF (*Colony Stimulating Factor*) atau faktor pertumbuhan hematopoietik merupakan sitokin yang merangsang ekspansi dan differensiasi sejumlah *stem cells* (terutama yang berada ditulang belakang) untuk memproduksi trombosit (trombopoiesis), eritrosit, neutrofil, monosit, eosinofil, dan basofil dimana masing-masing sel darah tersebut mempunyai umur yang pendek dalam darah (Oppenheim J.,J.,Ruscetti F.,W.,Faltynek C.,1991).

Empat limfokin utama yang mempunyai efek terhadap hematopoeisis pada manusia yaitu : M-CSF (makrofag-CSF), G-CSF (granulosit-CSF), GM-CSF (granulosit-makrofag CSF), multi CSF atau interleukin 3 (IL-3) (Remick D.,G.,Friedland Jon S.,1997). Interleukin-3 (IL-3) diproduksi oleh sel T, NK cells, dan *mast cells*. IL-3 merangsang pertumbuhan dan maturasi sel

pluripoten dalam sumsum tulang untuk menghasilkan sel-sel hematopoietik yaitu neutrofil, granulosit, makrofag, eritrosit, dan megakariosit (Tizard R., I., 1995). IL-3 dan GM-CSF juga merangsang pembentukan megakariosit yang merupakan bahan awal dari trombosit (Oppenheim J., J., Ruscetti F., W., Faltynek C., 1991).

Seperti diketahui, jambu biji dapat digunakan untuk mengobati penyakit demam berdarah dengue (DBD), dan telah terbukti bahwa ekstrak daun jambu biji dapat meningkatkan trombosit pada pasien demam berdarah dengue yang disertai trombositopenia. Disamping itu, ekstrak daun jambu biji terbukti dapat meningkatkan jumlah sel hematopoietik terutama megakariosit pada preparat dan kultur sumsum tulang mencit (www.kompas.com/kompas-cetak/0403/11/humaniora). Daun jambu biji mengandung berbagai macam komponen yang berkhasiat antara lain : tanin, minyak atsiri, minyak lemak, dan asam malat (Anonim, 1997), kuersetin, triterpenoid, dan striknin (Hargono D., 2003). Kuersetin, salah satu senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun jambu biji digunakan sebagai senyawa marker dalam meningkatkan trombosit pasien demam berdarah dengue (DBD). Disamping itu, kuersetin juga mempunyai khasiat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antivirus, menghambat agregasi platelet, dan immunomodulator (www.kompas.com/kompas-cetak/1013/11/humaniora)

Oleh karena itu untuk membuktikan pengaruh ekstrak daun jambu biji terhadap trombopoiesis pasien DBD perlu dilakukan uji praklinik dengan menggunakan hewan coba yang diberi perlakuan pemberian peroral ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan indikator interleukin 3. Pengujian pengaruh interleukin 3 terhadap trombopoiesis pasien demam berdarah dengue (DBD) yang diberi ekstrak etanol 70 % daun jambu biji menggunakan metode ELISA. ELISA merupakan salah satu metode pengukuran secara kuantitatif yang menggunakan prinsip interaksi antigen antibodi. ELISA menggunakan indikator enzim sebagai label. Pada penelitian ini, yang akan diukur adalah harga *optical density* (OD) interleukin-3 pada hewan coba (tikus) kelompok kontrol dan kelompok yang diberi perlakuan.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terhadap kadar interleukin 3 pada hewan coba (tikus) ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terhadap peningkatan interleukin 3 (IL-3) pada tikus.

1.4 Hipotesis

Ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dapat meningkatkan kadar interleukin 3 pada hewan coba (tikus).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat digunakan sebagai landasan bioaktivitas daun jambu biji sebagai obat demam berdarah dengue (DBD).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Tanaman Jambu Biji

2.1.1 Sistematika Tatanama (Taksonomi) Jambu Biji

Kingdom	: Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisi	: Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
Sub divisi	: Angiospermae (berbiji tertutup)
Kelas	: Dicotyledonae (biji berkeping dua)
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Genus	: <i>Psidium</i>
Spesies	: <i>Psidium guajava. L</i>

(Rukmana, 1996)

2.1.2 Morfologi Tanaman

Tumbuhan jambu biji merupakan tumbuhan semak atau pohon dengan tinggi 3-10 m, kulit batang halus permukaannya, berwarna coklat dan mudah mengelupas. Daun berhadapan, bertulang menyirip, berbintik, berbentuk bundar telur agak menjorong atau agak bundar sampai meruncing, panjang helai daun 6-14 cm, lebar 3-6 cm, panjang tangkai 3-7 mm, daun yang muda berambut, daun yang tua permukaan atasnya menjadi licin. Perbungaan terdiri dari 1-3 bunga, panjang gagang perbungaan 2-4 cm, panjang kelopak 7-10 mm, tajuk berbentuk bundar telur sungsang, panjang 1,5-2 cm. Buah bentuk bulat atau bulat telur, kalau masak berwarna kuning, panjang 5-8,5 cm, berdaging yang menyelimuti biji-biji dalam masa berwarna kuning atau merah jambu (Anonim, 1997).

2.1.3 Kandungan Tanaman

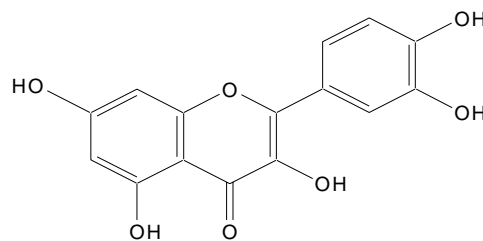
Jambu biji memiliki banyak sekali zat-zat kandungan yang terdapat pada hampir semua bagian tanaman, antara lain : akar (asam arjunolat, asam galat, leukosianidin, kuersetin); daun (minyak atsiri, minyak lemak, asam malat, tannin, striknin, triterpenoid, kuersetin); bunga (asam alegat,

guajaverin, leukosianidin, kuersetin); buah (vitamin A,B,C, tannin, sukrose, asam galat, kuersetin (Anonim, 1997; Hargono D., 2003).

2.1.4 Khasiat Jambu Biji

Tumbuhan jambu biji memiliki khasiat untuk pengobatan, baik untuk pengobatan dalam maupun untuk pengobatan luar. Untuk pengobatan dalam antara lain : obat disentri, diare, antiinflamasi, untuk mengobati gastroenteritis akut dan kronik, demam berdarah (jus buah jambu biji yang daging buahnya merah), diabetes mellitus, sariawan, antibakteri, antimikroba, antispasmodik, analgesik, antipiretik, hemostatikum. Untuk pengobatan luar antara lain : membasuh luka, mandi dan membasuh vagina setelah persalinan, serta untuk gigi berlubang (Anonim, 1997; Hargono D., 2003).

2.1.5 Tinjauan Tentang Kuersetin



Gambar 2.1 Struktur kimia kuersetin

Kuersetin merupakan senyawa polifenol yang tergolong kedalam senyawa flavonoid kelompok flavonol. Kuersetin dalam tanaman ditemukan sebagai glikon atau karbohidrat terkonjugasi, tetapi kuersetin sendiri merupakan suatu aglikon (www.pdrhealth.com/drug-info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/que). Kuersetin disebut juga dengan meletin, sophoretin, cyanidenolon, merupakan senyawa dengan rumus molekul $C_{15}H_{10}O_7$, rumus kimia 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone (Harborne J.,B., 1999).

Kuersetin memiliki efek farmakologis antara lain antioksidan antiinflamasi, menghambat *chemokines* dan sitokin, menghambat aktivitas enzim *reverse transcriptase* yang berarti menghambat pertumbuhan virus berinti RNA (antivirus), immunomodulator, antikanker, antialergi, dan mencegah penyakit kardiovaskuler dengan menghambat agregasi platelet. Studi *in vitro* pada hewan coba menunjukkan bahwa kuersetin menghambat

degranulasi *mast cells*, basofil, dan neutrofil (www.pdrhealth.com/drug-info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/que.0219.shtml dan www.chronicprostatitis.com/qfacts.html).

2.2 Tinjauan Tentang Ekstrak

Dalam Farmakope Indonesia edisi IV disebutkan bahwa ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Anonim, 1995).

Metode ekstraksi yang sering digunakan untuk menarik kandungan kimia yang terkandung dalam tanaman (simplisia) adalah dengan cara dingin, yaitu maserasi dan perkolasi. Maserasi adalah proses pengekstraksian simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Sedangkan perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) umumnya pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Anonim, 2000).

Perkolasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang telah banyak digunakan pada skala laboratorium maupun industri. Dimana sebelum dilakukan perkolasi, bahan (material) diperkecil ukurannya menjadi serbuk dengan alat penggiling. Proses perkolasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya :

- Selektifitas pelarut (solven)

Selektifitas pelarut sangat berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas komposisi (kandungan) yang terdapat dalam simplisia (bahan/material).

- Jumlah aliran (tetesan)

Laju (kecepatan) aliran menentukan waktu kontak antara pelarut dengan bahan. Semakin rendah kecepatan aliran maka waktu kontak pelarut

dengan bahan semakin lama, sehingga kandungan zat aktif yang didapat semakin banyak. Tetapi hal ini juga memperlama waktu pengekstraksian.

- Temperatur (suhu)

Menurut Farmakope Indonesia IV, perkolasi dilakukan dengan cara mencampur secara hati-hati serbuk bahan obat atau campuran bahan obat dengan campuran pelarut tertentu secukupnya, hingga rata dan cukup basah, kemudian dibiarkan 15 menit campuran dipindahkan kedalam perkolator yang sesuai, dan dimampatkan. Kedalamnya dituangkan secukupnya pelarut atau campuran pelarut tertentu sampai terendam seluruhnya, bagian atas perkolator ditutup dan jika cairan habis menetes dari perkolator, lubang bawah ditutup. Perkolasi selama 24 jam atau sesuai dengan waktu yang tertera dalam monografi. Perkolasi dilakukan secara perlahan atau pada kecepatan yang telah ditentukan dan secara bertahap ditambahkan pelarut atau campuran pelarut secukupnya hingga diperoleh 1000 ml tingtur (Anonim,1995).

2.3 Tinjauan Tentang Demam Berdarah

2.3.1 Definisi/Batasan Demam Berdarah

Demam dengue (dengue fever) adalah penyakit yang terutama terdapat pada anak remaja atau orang dewasa, dengan tanda-tanda klinis demam, nyeri otot dan/atau nyeri sendi yang disertai leukopenia, dengan/tanpa ruam (rash) dan limfadenopati, demam bifasik, sakit kepala yang hebat, nyeri pada pergerakan bola mata, rasa mencecap yang terganggu, trombositopenia ringan dan bintik-bintik perdarahan (petekie) spontan.

Demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit yang terdapat pada anak dan dewasa dengan gejala utama demam, nyeri otot dan sendi, yang biasanya memburuk setelah dua hari pertama. Uji terniquet akan positif dengan tanpa ruam disertai beberapa atau semua gejala perdarahan seperti petekie spontan yang timbul serentak, purpura, ekimosis, epitaksis, hematemesis, melena, trombositopenia, masa perdarahan dan masa protrombin memanjang, hematokrit meningkat dan gangguan maturasi megakariosit. Sindrom renjatan dengue (DSS) ialah penyakit DHF yang disertai renjatan (Hendarwanto, 1994).

2.3.2 Etiologi/Penyebab Demam Berdarah Dengue

Demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD) dan dengue syok syndrom (DSS) disebabkan oleh virus dengue. Virus dengue tergolong kelompok B Arthropode borne virus (Arbovirus) dan kini dikenal dengan genus flavivirus dengan familia Flaviviridae. Terdapat empat serotipe yaitu Den-1, Den-2, Den-3, dan Den-4. Infeksi dengan salah satu serotipe akan menimbulkan antibodi seumur hidup terhadap serotipe yang bersangkutan tetapi tidak ada perlindungan terhadap serotipe yang lain. Seseorang yang tinggal di daerah endemis dengue dapat terinfeksi dengan 3 atau bahkan 4 serotipe selama hidupnya. Di Indonesia, pengamatan menunjukkan adanya keempat jenis virus dengue yang beredar sepanjang tahun. Serotipe den-3 merupakan serotipe yang paling sering ditemukan dan berkaitan erat dengan berat derajat klinik (Sri Rejeki, 1999; Ade, N., Agustina, R., Amin, F., 2002).

Virus dengue ditularkan pada manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis*. Penularannya dapat langsung yaitu melalui gigitan pada orang yang sedang mengalami viremia, maupun secara tidak langsung setelah melalui inkubasi dalam tubuhnya, yakni selama 8-10 hari (*Extrinsic incubation period*). Pada anak diperlukan waktu 4-6 hari (*intrinsic incubation period*) sebelum menjadi sakit setelah virus masuk ke dalam tubuh. Pada nyamuk sekali virus dapat masuk dan berkembangbiak dalam tubuhnya, maka nyamuk tersebut akan dapat menularkan virus selama hidupnya (infektif). Sedangkan pada manusia, penularan hanya dapat terjadi pada saat tubuh dalam keadaan viremia yaitu antara 5-7 hari (Soegijanto, 1999; Ade, N., Agustina, R., Amin, F., 2002).

2.3.3 Epidemiologi Demam Berdarah Dengue

Epidemi dengue dilaporkan pertama kali di Batavia oleh David Baylon pada tahun 1779, sedangkan DHF mula-mula dikemukakan oleh Quintos dan kawan-kawan di Manila pada anak-anak pada tahun 1954. Penyakit dengue merupakan penyakit endemik di Indonesia, tetapi dalam jarak 5 sampai 20 tahun dapat timbul letusan epidemi (Hendarwanto, 1994). Infeksi virus dengue dikenal juga sebagai penyakit demam lima hari kadangkala disebut juga demam sendi (*knokkel koorts*). Disebut demikian oleh karena demam

menghilang dalam lima hari, disertai nyeri pada sendi, nyeri otot, dan nyeri kepala hebat (Sri rejeki, 1999).

Demam berdarah dengue (DHF) di Indonesia, pertama kali dicurigai berjangkit di Surabaya pada tahun 1968, tetapi kepastian virologik baru diperoleh pada tahun 1970. DHF pada orang dewasa dilaporkan pertama kali oleh Swandana (1970) yang kemudian secara drastis meningkat dan menyebar ke seluruh Dati I di Indonesia (Hendarwanto, 1994).

2.3.4 Patogenesis dan Patofisiologis Demam Berdarah Dengue

Patogenesis DBD dan SSD masih merupakan masalah yang kontraversi. Dua teori yang umum dipakai dalam menjelaskan perubahan patogenesis pada DBD dan SSD, yaitu hipotesis infeksi sekunder (teori *secondary heterologous infection*) atau hipotesis *immune enhancement*. Hipotesis ini menyatakan secara tidak langsung bahwa pasien yang mengalami infeksi kedua kalinya dengan virus dengue serotipe yang heterolog, mempunyai resiko lebih besar untuk kemungkinan mendapatkan DBD/SSD. Sebagai tanggapan terhadap infeksi tersebut, terjadi sekresi mediator vasoaktif yang kemudian menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, sehingga mengakibatkan keadaan hipovolemia dan syok.

Hipotesis kedua, menyatakan bahwa virus dengue seperti semua halnya virus binatang yang lain, secara genetik dapat berubah sebagai akibat dari tekanan pada seleksi sewaktu virus melakukan replikasi pada tubuh manusia maupun nyamuk. Di samping itu, terdapat beberapa strain virus yang mempunyai kemampuan untuk menimbulkan wabah lebih besar. Ekspresi fenotipik dan perubahan genetik di dalam genom virus dapat menyebabkan peningkatan replikasi virus dan viremia, atau virulensi.

Sebagai tanggapan terhadap infeksi tersebut, terjadi (1) aktivasi sistem komplemen sehingga dikeluarkan zat anafilatoksin yang menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler dan terjadi perembesan plasma dari ruang intravaskuler ke ekstrasvaskuler; (2) agregasi trombosit sehingga jumlah trombosit menurun, apabila kejadian ini berlanjut akan menyebabkan kelainan fungsi trombosit sebagai akibat mobilisasi sel trombosit muda dari sumsum tulang, dan (3) kerusakan sel endotel pembuluh darah yang akan

merangsang/mengaktivasi faktor pembekuan. Ketiga faktor tersebut dapat menyebabkan, (a) peningkatan permeabilitas kapiler sehingga mengakibatkan perembesan plasma, hipovolemia, dan syok. Perembesan plasma pada DBD mengakibatkan adanya cairan didalam rongga pleura dan rongga peritoneal yang berlangsung singkat, selama 24-48 jam; (b) kelainan hemostasis, yang disebabkan oleh vaskulopati, trombositopenia, dan koagulopati, sehingga mengakibatkan perdarahan hebat (Sri rejeki, 1999).

2.3.5 Kriteria Diagnosis Demam Berdarah Dengue

Diagnosis demam berdarah dengue (DBD) menurut WHO 1986 didasarkan pada 4 kriteria klinis dan 2 kriteria laboratorik sebagai berikut :

Kriteria klinis :

1. Demam tinggi 2-7 hari, berlangsung terus menerus dengan sebab yang tidak jelas dan hampir tidak dapat dipengaruhi oleh antipiretika maupun *surface cooling*.
2. Manifestasi perdarahan
 - a. Dengan manipulasi, yaitu Terniquet Test/Rumpell Leidy (RL) positif.
 - b. Spontan seperti petekie, ekimosis, purpura, epistasis, gum bleeding, hematemesis, melena.
3. Hepatomegali : Hepar lebih dari 2 cm atau hepar yang sebelumnya tidak teraba, pada waktu sakit teraba 2 cm atau lebih.
4. Syok: sistole turun menjadi 80 mmHg atau lebih rendah, *pulse pressure* menjadi 20 mmHg atau lebih rendah bahkan sampai nol, nadi kecil dan cepat sampai tak teraba, ekstremitas dingin, berkeringat dingin, lemah/gelisah sampai menurunnya kesadaran, nyeri perut/epigastrium dan muntah-muntah.

Kriteria Laboratorik :

1. Trombositopenia : jumlah trombosit menjadi 100.000 mm^3 atau kurang.
2. Hemokonsentrasi : Dimana hematokrit (PCV) meningkat 20 % atau lebih atau PCV lebih dari 45 (Rampengan, T.,H.,1986).

Diagnosis DBD dapat ditegakkan bila terdapat 2 kriteria laboratorik ditambah 2 kriteria klinis atau lebih.

Derajat beratnya penyakit (keganasannya) dibagi empat tingkat yaitu :

- Derajat 1 : Demam dengan gejala-gejala non-spesifik, serta satu-satunya tanda perdarahan adalah terniquet test positif.
- Derajat 2 : gejala-gejala diatas ditambah perdarahan spontan dikulit, atau perdarahan yang lain.
- Derajat 3 : Kegagalan sirkulasi, denyut nadi cepat, lemah dengan tekanan yang menurun (20 mmHg atau kurang) atau hipotensi dengan kulit yang dingin, kasar bersisik dan penderita gelisah.
- Derajat 4 : Syok yang dalam dengan tekanan darah yang tidak terukur dan denyut nadi tidak teraba (Rampengan, T.,H., 1986) .

2.3.6 Pengobatan Demam Berdarah Dengue

Pengobatan demam berdarah dengue bersifat suportif. Tatalaksana berdasarkan kelainan utama yang terjadi yaitu perembesan plasma sebagai akibat dari peningkatan permeabilitas kapiler. Perembesan plasma yang berlangsung selama 24-48 jam akan menyebabkan terjadinya syok, anoksia, asidosis, dan kematian. Pemberian cairan kristaloid isotonik merupakan pilihan untuk menggantikan volume plasma. Pemakaian obat-obat lain diberikan atas indikasi yang tepat.

2.4 Tinjauan Tentang Sistem Imun

2.4.1 Definisi/Batasan Sistem Imun

Imunitas merupakan mekanisme fisiologis yang membantu tubuh untuk mengenal benda-benda asing pada dirinya, untuk menetralkan, menyisikan atau memetabolisme benda asing tersebut dengan atau tanpa kerusakan pada jaringannya sendiri (Bellanti, Joseph, A., 1993).

2.4.2 Pengelompokan Sistem Imun

1) Sistem imun non spesifik

Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena dapat memberikan respon langsung terhadap antigen, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir yang berupa permukaan tubuh dan berbagai komponen dalam tubuh. Komponen-komponen sistem imun nonspesifik dapat dibagi sebagai berikut : pertahanan fisik/mekanik (kulit, selaput lendir, silia saluran nafas); pertahanan biokimia (lisozim dalam keringat,

ludah, air mata, air susu, melindungi tubuh dari kuman gram positif); pertahanan humoral (komplemen, interferon, CRP); pertahanan seluler (fagosit, makrofag, sel NK).

2) Sistem imun spesifik

Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Sistem imun spesifik dibagi menjadi dua yaitu : humoral (yang berperan adalah limfosit B) dan seluler (yang berperan adalah limfosit T) (Baratawidjaja, 1991).

2.4.3 Respon Imun pada Demam Berdarah Dengue

Respon kekebalan tubuh pada penderita demam berdarah dengue dan demam dengue terdiri dari respon imun nonspesifik dan spesifik yang meliputi respon imun humoral dan respon seluler.. Pada respon kekebalan tubuh nonspesifik penderita DBD yang berperan adalah makrofag, komplemen dan trombosit. Sedangkan pada respon kekebalan spesifik (humoral) yang berperan adalah IgG dan IgM bekerjasama dengan kekebalan tubuh nonspesifik membentuk *antibody dependent cytotoxic cells* (AADC). Sedangkan pada respon kekebalan spesifik (seluler) yang berperan adalah sel limfosit T-sitotoksik. CD 8, MHC I, IL-1, IL-6, TNF alfa, dan interferon (Novriani, Harii, 2002) .

2.5 Tinjauan Tentang Trombosit

Unsur seluler darah terdiri dari sel darah merah (eritrosit), beberapa jenis sel darah putih (leukosit), dan pecahan sel yang disebut trombosit. Fungsi sel darah merah adalah mengangkut dan melakukan pertukaran O₂ dan CO₂ sedangkan fungsi sel darah putih adalah untuk mengatasi infeksi dan trombosit untuk hemostasis. Hematopoiesis (pembentukan dan pematangan sel darah) terjadi dalam sumsum tulang tengkorak, vertebra, pelvis, sternum, iga-iga, dan epifis proksimal tulang-tulang panjang. Bila kebutuhan meningkat seperti pada perdarahan atau penghancuran sel (hemolisis), pembentukan dapat timbul lagi dalam seluruh tulang panjang seperti halnya pada anak-anak (Baldy, C.,M., 1995).

Trombosit atau platelet bukan merupakan sel, melainkan pecahan granular sel, berbentuk piringan dan tidak berinti. Trombosit adalah bagian

terkecil dari unsur seluler sumsum tulang dan sangat penting peranannya dalam hemostasis dan pembekuan. Trombosit berasal dari sel induk pluripotensial yang tidak terikat, yang bila dibutuhkan dan dengan adanya faktor perangsang trombosit (Mk-CSF/ *Megakariosit Colony Stimulating factor*) berdiferensiasi menjadi kelompok sel induk yang terikat untuk membentuk megakarioblas. Sel ini, melalui serangkaian proses pematangan menjadi megakariosit raksasa. Tidak seperti unsur sel lainnya, megakariosit mengalami endomitosis, dimana terjadi pembelahan inti didalam sel, tetapi sel itu sendiri tidak membelah. Sel dapat membesar karena sintesis DNA meningkat. Sitoplasma sel akhirnya memisahkan diri menjadi trombosit-trombosit (Baldy, C.,M., 1995).

Trombosit berdiameter 1 sampai 4 μ m dan berumur kira-kira 10 hari. Kira-kira sepertiga berada dalam limpa sebagai sumber cadangan dan sisanya berada dalam sirkulasi, berjumlah antara 150.000 dan 400.000/mm³. Jika digunakan pewarnaan *Wright* pada sediaan hapus perifer, maka sel-sel ini tampak biru muda dengan granula warna ungu kemerahan. Yang diabsorpsi pada membran trombosit adalah faktor V, VIII, dan IX, protein kontraktilektomiosin, atau trombostenin, dan berbagai protein serta enzim lain. Granula mengandung serotonin vasokonstriktor yang kuat, faktor agregasi adenosin difosfat (ADP), fibrinogen, faktor 3 dan 4 trombosit (faktor penetral heparin), dan kalsium serta enzim-enzim lain. Semua faktor-faktor ini dilepaskan dan diaktifkan akibat respon terhadap cedera (Baldy, C., M., 1995).

Setiap hari, tubuh orang dewasa memproduksi 1×10^{11} trombosit yang akan meningkat 10 kali lipat ketika kebutuhan meningkat. Seluruh bagian trombosit dibentuk dari hematopoietik *stem cells*, melalui beberapa bagian sel. Proses proliferasi seluler dan diferensiasi ini membutuhkan dukungan interleukin (IL), CSF, dan hormon. Trombopoitin (TPO) bersama sitokin lain, memiliki peran dalam maturasi megakariosit (Pavitrana, 2003).

Faktor-faktor pembekuan, kecuali faktor III (tromboplastin jaringan) dan faktor IV (ion kalsium), merupakan protein plasma. Faktor-faktor ini bersirkulasi dalam darah sebagai molekul-molekul yang tidak aktif. Pengaktifan faktor-faktor pembekuan diduga terjadi karena enzim

memecahkan fragmen bentuk prekursor yang tidak aktif, oleh karena itu dinamakan prokoagulan. Tiap faktor yang sudah diaktifkan, kecuali V, VII, dan XII serta I (fibrinogen), adalah enzim pemecah protein (protease serin), sehingga mengaktifkan prokoagulan berikutnya (Baldy, C.,M.,1995).

Gangguan pada faktor-faktor pembekuan ini dapat menyebabkan gangguan terhadap masa perdarahan. Pada beberapa kasus DBD ditemukan adanya penurunan fibrinogen, protrombin, faktor VIII, XII, dan antitrombin III, serta α -antiplasmin (α -plasmin inhibitor). Pada penderita DBD disertai disfungsi liver juga ditemukan penurunan tingkat faktor protrombin yang tergantung vitamin K, seperti faktor V, VII, IX, dan X. Akibatnya *Partial Tromboplastin Time* (PTT) dan *Protrombin Time* (PT) meningkat. Sebagian mengalami peningkatan *Trombin Time* (TT). Fungsi platelet (trombosit) menurun dan terjadi penurunan tingkat serum komplemen, terutama C3.

Penyebab perdarahan pada pasien penyakit DBD ialah vaskulopati, trombositopenia dan gangguan fungsi trombosit, serta koagulasi intravaskuler yang menyeluruh. Jenis perdarahan yang terbanyak adalah perdarahan kulit seperti uji terniquet positif, petekie, purpura, ekimosis dan perdarahan konjungtiva. Petekie merupakan tanda perdarahan yang tersering ditemukan. Tanda ini dapat muncul pada hari-hari pertama demam. Petekie sering sulit dibedakan dengan bekas gigitan nyamuk (Sri rejeki, 1999). Petekie merupakan lesi perdarahan keunguan, mendatar 1-4 mm, bulat, tidak memucat, berdarah, dan dapat bergabung menjadi lesi yang lebih besar yang dinamakan purpura. Dapat ditemukan pada membran mukosa dan kulit, khususnya didaerah tertentu. Petekie umumnya menggambarkan kelainan trombosit (Baldy, C.,M., 1995).

Ekimosis, tanda memar atau tanda biru kehitaman, adalah daerah makula besar akibat ekstrasvasasi darah kedalam jaringan subkutan kulit. Perdarahan yang baru berwarna biru kehitaman dan berubah warna menjadi hijau kecoklatan dan menjadi kuning bila mengalami resolusi. Walaupun ekimosis sering ditemukan pada trauma, tetapi ekimosis yang luas dapat menggambarkan kelainan trombosit atau gangguan pembekuan (Baldy, C., M., 1995).

Perdarahan lain yaitu epistaksis, perdarahan gusi, hematemesis dan melena. Epistaksis dan perdarahan gusi lebih jarang ditemukan, sedangkan perdarahan gastrointestinal biasanya terjadi menyertai syok. Perdarahan yang paling ringan adalah uji terniquet positif, berarti fragilitas kapiler meningkat (Sri Rejeki,1999).

Trombositopenia didefinisikan sebagai jumlah trombosit dibawah $100.000/\text{mm}^3$. Ini bisa disebabkan baik oleh pembentukan trombosit yang berkurang atau penghancuran yang meningkat. Namun, umumnya tidak ada manifestasi klinis sampai jumlahnya berada dibawah 100.000 dan dipengaruhi oleh keadaan-keadaan lain atau disertai dengan leukemia atau penyakit hati. Ekimosis yang bertambah dan perdarahan yang lama akibat trauma ringan ditemukan pada jumlah kurang dari $50.000/\text{mm}^3$. Petekie adalah manifestasi utama yang ditemukan bila jumlah kurang dari 30.000 . Perdarahan mukosa, jaringan dalam dan intrakranial ditemukan bila jumlah kurang dari 20.000 , dan keadaan ini memerlukan tindakan segera untuk mencegah perdarahan dan kematian (Baldy, C., M.,1995) .

Pembentukan trombosit yang menurun, dibuktikan oleh aspirasi dan biopsi sumsum tulang, dan bisa terjadi pada setiap keadaan yang mengganggu atau menghambat fungsi sumsum tulang. Ini mencakup anemia aplastik, mielofibrosis (penggantian unsur-unsur sumsum tulang oleh jaringan fibrosa), leukemia akut, dan karsinoma metastatik lain yang menggantikan unsur-unsur sumsum normal. Pada keadaan-keadaan defisiensi, seperti defisiensi vitamin B_{12} dan asam folat, akan mempengaruhi megakariopoeisis yang disertai pembentukan megakariosit besar yang hiperlobulus. Agen-agen kemoterapeutik khususnya yang bersifat toksik terhadap sumsum tulang, juga akan menekan pembentukan trombosit (Baldy, C.,M.,1995).

Keadaan trombositopenia dengan pembentukan trombosit normal, biasanya disebabkan oleh penghancuran atau penyimpanan yang berlebihan. Setiap keadaan yang menyebabkan splenomegali (limpa yang jelas membesar) dapat disertai dengan trombositopenia. Ini mencakup keadaan pada penyakit sirosis hati, limfoma. dan mieloproliferatif. Limpa normal menyimpan

sepertiga trombosit yang dihasilkan, tetapi pada splenomegali, sumber ini dapat meningkat sampai 80 % dan mengurangi sumber sirkulasi yang tersedia.

Trombosit dapat juga dihancurkan oleh pembentukan antibodi yang diakibatkan oleh obat, seperti yang ditemukan pada kinidin dan emas atau oleh otoantibodi (antibodi yang bekerja melawan jaringannya sendiri). Ini ditemukan pada penyakit seperti lupus eritematosus, leukemia limfositik kronik, limfoma tertentu, dan purpura trombositopenia idiopatik (ITP). Yang terakhir ini, terutama ditemukan pada wanita muda, dimanifestasikan dengan trombositopenia berat yang mengancam kehidupan dengan jumlah trombosit yang sering kurang dari $10.000 /\text{mm}^3$. Antibodi IgG yang ditemukan pada membran trombosit akan mengakibatkan pembuangan dan penghancuran trombosit oleh sistem makrofag (Baldy, C.,M., 1995).

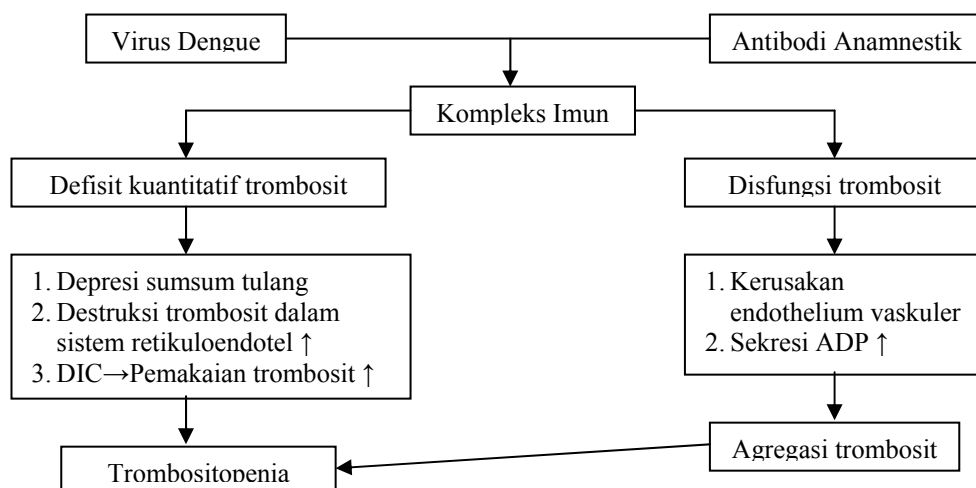
Protein plasma seperti yang ditemukan pada mikroglobulinemia dan mieloma multipel menyelubungi trombosit, mengganggu adhesi trombosit, retraksi bekuan, dan polimerisasi fibrin. Pada semua keadaan ini, dengan memperbaiki gangguan yang mendasarinya akan memperbaiki fungsi trombosit abnormal tersebut (Baldy, C., M., 1995).

Penelitian sumsum tulang pada pasien dengan DBD menunjukkan adanya depresi sumsum tulang yaitu tahap hiposeluler pada hari ke 3-4 demam dan perubahan patologis sistem megakariosit. Dari penelitaan dengan radioisotop dibuktikan adanya destruksi trombosit dalam sistem retikuloendotel yaitu dalam limpa dan hepar. Juga masa paruh dari trombosit memendek hingga 53-65 jam (normal 72-96 jam). Peranan pembekuan intavaskuler tersebar (DIC=*Disseminated Intravaskular Coagulation*) pada pasien DBD telah banyak diselidiki. Akibat koagulasi intravaskular, pemakaian faktor-faktor pembekuan dan trombosit meningkat sehingga terjadi trombositopenia. Jadi pada pasien DBD terjadi penurunan produksi, meningkatnya destruksi dan pemakaian trombosit berlebih sehingga terjadi trombositopenia (Sugianto, D., Tatang, K., dkk, 1994).

Selain mengalami defisit secara kuantitatif, juga terdapat gangguan fungsi trombosit. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya sekresi ADP dan metabolit prostasiklin plasma (PGI_2) yaitu 6-keto-PGF_{1a}(6KPGF₁). Trombosit

dalam sirkulasi tidak akan melekat pada endothelium vaskular, kecuali bila ada aktivasi misalnya kerusakan lapisan intima vaskular atau robekan struktur vaskuler (Sugianto, D., Tatang, K., dkk, 1994).

Respon trombosit terhadap aktivasi tersebut, secara umum ada 4 tipe yaitu : (1) perubahan bentuk trombosit dari keping pipih menjadi bulat berduri; (2) adhesi, melekatnya trombosit pada subendotelium dinding pembuluh darah atau pada jaringan kolagen; (3) agregasi, melekatnya trombosit satu sama lain; (4) sekresi, misalnya ADP, tromboksan A_2 , serotonin, kalsium dan lain-lain. ADP disekresi oleh granula padat yang terdapat dalam trombosit, sedangkan prostasiklin plasma (PGI_2) dibentuk oleh sel endotel dan otot polos pembuluh darah. ADP menginduksi agregasi trombosit terhadap trombosit yang sudah melekat pada dinding pembuluh darah yang rusak, sedangkan PGI_2 merupakan inhibitor agregasi trombosit. Efek PGI_2 selain berlawanan dengan ADP, juga berlawanan dengan tromboksan A_2 (TXA_2) yang juga disekresi oleh granula padat dalam trombosit (Sugianto, D; Tatang, K., dkk, 1994). Mekanisme yang menyebabkan terjadinya defisit kuantitatif dan disfungsi trombosit belum diketahui dengan jelas. Diduga karena kompleks imun (kompleks antigen dengue, immunoglobulin dan komplemen globulin) yang ditemukan pada permukaan trombosit (Sugianto, D., Tatang K., 1994) .



Gambar 2.2 Mekanisme terjadinya trombositopenia pada DBD

2.6 Tinjauan Tentang Interleukin-3

Menurut teori *antibody enhancing*, bahwa makrofag yang terinfeksi virus mengeluarkan mediator atau sitokin. Sitokin merupakan sekelompok protein signal interseluler yang meregulasi tidak hanya imun lokal dan sistemik dan respon inflamasi tetapi juga penyembuhan luka, hematopoiesis dan proses biologik yang lain (Oppenheim, J., J., et., al., 1991). Fungsi dan mekanisme kerja sitokin adalah sebagai mediator pada imunitas alami yang disebabkan oleh ransangan zat yang infeksius, sebagai regulator yang mengatur aktivasi, proliferasi, dan differensiasi limfosit, sebagai aktivator sel inflamasi nonspesifik, dan sebagai stimulator pertumbuhan dan differensiasi leukosit matur. Sitokin diproduksi oleh banyak sel terutama makrofag mononuklear dimana dalam keadaan normal sitokin tidak terbentuk sehingga tidak dijumpai didalam plasma (Sugiyanto S., 2004). Sitokin yang diproduksi oleh limfosit disebut sebagai limfokin.

CSF (*Colony Stimulating Factor*) atau faktor pertumbuhan hematopoietik merupakan sitokin yang merangsang ekspansi dan differensiasi sejumlah *stem cells* (terutama yang berada ditulang belakang) untuk memproduksi platelet (trombosit), eritrosit, neutrofil, monosit, eosinofil, dan basofil dimana masing-masing sel darah tersebut mempunyai umur yang pendek dalam darah (Oppenheim, J., J., Ruscetti, F.W., Faltynek, C., 1991).

Empat limfokin utama yang mempunyai efek terhadap hematopoiesis pada manusia yaitu : (1) makrofag CSF (M-CSF/CSF-1) merangsang pembentukan koloni makrofag; (2) granulosit CSF (G-CSF) yang merangsang pembentukan koloni netrofil, granulosit; (3) granulosit-makrofag CSF (GM-CSF) yang merangsang pembentukan koloni neutrofil granulosit, eosinofil dan makrofag, (4) multi CSF atau IL-3 (interleukin 3) merangsang pembentukan koloni neutrofil, granulosit, makrofag, megakariosit, dan eritrosit (Remick, D.G., Friedland, Jon S., 1997). Pada dasarnya limfokin tersebut merangsang differensiasi sel asal dalam sumsum tulang menjadi sel yang spesifik (Baratawidjaja K., G., 1991).

CFS telah dideteksi (Robinson, 1988) dalam berbagai jaringan tubuh, dan dalam serum dan urin manusia (Golde, 1983; Barr dan Symore, 1982).

Kadar CSF yang dapat dideteksi didapat dalam serum selama masa peradangan, infeksi virus dan stress. Tampaknya terus ada peningkatan produksi setelah stimulasi oleh berbagai antigen dan mikroorganisme serta produk-produk mikroorganisme tersebut, seperti endotoksin (Robinson, 1988).

Pada awalnya interleukin 3 (IL-3) didefinisikan sebagai faktor penginduser enzim 20α -hidroksisteroid dehidrogenase, yang dipercaya untuk menjadi *marker* pada maturasi sel T, IL-3 juga merupakan dasar untuk terjadinya diferensiasi sel T. IL-3 digunakan untuk mengidentifikasi *Burst promoting activity* (BPA), faktor pengaktivasi stem cells, faktor perangsang sel P, faktor pertumbuhan *mast cells*, faktor sinergistik dan multi CSF (Remick, D., G., Friedland, Jon s., 1997).

IL-3 diproduksi oleh sel T teraktivasi, NK cells, dan *mast cells*. IL-3 merangsang pertumbuhan dan maturasi sel pluripoten dalam sumsum tulang. Injeksi IL-3 menyebabkan peningkatan eosinofil, neutrofil, dan monosit dalam darah. IL-3 merangsang differensiasi dan aktivasi *mast cells* dan basofil. IL-3 juga mempengaruhi sekresi immunoglobulin oleh sel B (Tizard, R., I., 1995)

Pada studi *in vitro* IL-3 merangsang pembentukan : (1) koloni granulosit dan/ makrofag, (2) sel *erithroid burst forming*, (3) CFC yang berisi granulosit, makrofag, sel erithroid dan megakariosit, (4) *spleen colony forming cells* (CFU-S) *generation*, (5) pembentukan koloni eosinofil, (6) pembentukan koloni *mast cells*, dan (7) proliferasi faktor *dependent mast cells* (Remick, D., G., Friedland, Jon S., 1997). GM-CSF bersama-sama dengan IL-3 juga merangsang pembentukan megakariosit yang merupakan bahan awal dari trombosit (Oppenheim, J.J., Ruscetti, F., W., Faltynek, C., 1991).

Pada studi *in vivo* terhadap kera yang dilakukan oleh Stahl C.P et.al (1992) membuktikan bahwa GM-CSF juga berperan terhadap pembentukan trombosit (*trombopoeisis*). Darah kera diberi perlakuan pemberian 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ IL-3 dan 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ GM-CSF secara berurutan selang waktu 4 hari, secara simultan, dan pemberian tunggal. Hasilnya pada hari 11 dan 12 terjadi peningkatan jumlah platelet pada pemberian secara berurutan IL-3 dan GM-CSF. Distribusi megakariosit juga secara signifikan berubah antara hari ke-7 dan 10 pada kera yang diberi IL-3 dan GM-CSF secara berurutan, diantara

hari ke-3 dan ke-15 pada kera yang diberi kombinasi (pemberian bersamaan) IL-3 dan GM-CSF dan kera yang diberi GM-CSF tunggal, tetapi hal ini tidak terjadi pada pemberian IL-3 tunggal. Dapat disimpulkan bahwa pemberian IL-3 yang diikuti dengan GM-CSF meningkatkan trombopoiesis dimana secara berurutan terjadi peningkatan jumlah megakariosit dan maturasi. Efek ini berkurang bila pemberian dilakukan secara bersamaan (simultan).

2.7 Tinjauan Tentang ELISA

Imunoasai merupakan cara penentuan kadar imunitas/kadar antibodi atau antigen dalam cairan tubuh atau spesimen lain. Sesuai dengan definisi tersebut, maka konsep dasar imunoasai ialah reaksi antigen dan antibodi yang selanjutnya akan membentuk kompleks. Dalam garis besarnya, imunoasai dapat dibagi menjadi dua kelompok (Porstmann, 1992) yaitu : imunoasai tanpa label, didasarkan pada reaksi imun sekunder; dan imunoasai berlabel didasarkan pada reaksi imun primer dan dapat dibagi menjadi dua tipe yang bergantung pada reaksi yang terjadi (*reagent-observed* dan *analyte-observed*).

Imunoasai enzim walaupun banyak variasinya namun dari segi prinsip dasar reaksinya dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu :

- a. Asai yang *reagent observed*, dipakai dua macam antibodi sebagai pengikat atau analit dalam jumlah yang berlebihan sehingga hanya dapat dipakai untuk menentukan analit yang mempunyai molekul besar dengan sedikitnya dua epitop yang berbeda jelas satu terhadap yang lain dan dengan demikian dapat mengikat antibodi berlabel maupun tidak berlabel.
- b. Asai yang *analyte observed*, secara teoritis hanya memiliki sensitivitas laboratories sebesar 10^{-14} mol/l (Ekins, 1981) dan diperkirakan satu sampai dua tingkat dibawah detektabilitas dari tipe pertama yang disebut juga asai dua sisi atau asai *sandwich* (Jackson, 1983).

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) merupakan salah satu metode pengukuran secara kuantitatif yang menggunakan prinsip interaksi antigen-antibodi. ELISA menggunakan indikator enzim sebagai label (Burges, G., W., 1995) . Metode ini memakai antibodi terikat enzim dan titik akhir pengukuran adalah pembentukan produk enzimatik dari substratnya yang dapat diukur dengan *colorimetry* atau dengan mata biasa. Metode ini

mempunyai penerapan klinik yang sangat luas pada serodiagnosis banyak penyakit, meliputi penyakit infeksi terutama infeksi virus.

Enzim yang paling banyak dipakai adalah *horseradish peroksidase* (HRP), *fosfatase alkali* (AP), urease, β -galaktosidase dan oksidase glucose. Alkali fosfatase umum digunakan dalam penelitian tanaman di sini aktivitas peroksidasinya dapat besar akan tetapi sebaliknya HRP adalah enzim yang paling umum dipakai. (Burgess, G., W., 1995).

Penelitian menggunakan Ab berlabel dikenalkan oleh Miles dan Hales (1968) berdasarkan prinsip immunometrik dengan menggunakan jumlah Ab berlebih. Ag bereaksi dengan Ab berlabel, kemudian terjadi pemisahan antara yang terikat dengan reaktan bebas, sehingga Ab yang terikat dapat diketahui. Pada metode ini, tidak diperhatikan seberapa rendah konsentrasi Ag jika Ab dalam jumlah cukup ditambahkan, sebagian Ab akan membentuk kompleks selama waktu yang diberikan. Dimana kecepatan pembentukan kompleks dapat dinyatakan dengan persamaan $KI(Ag)(Ab)$.

Konfigurasi ELISA yang paling umum menggunakan substrat padat. *Assay* asli menggunakan permukaan gelas yang sebelumnya telah diperlakukan untuk meningkatkan absorpsi baik antigen maupun antibodi. Sekarang plastik telah hampir secara universal diterima sebagai pilihan untuk substrat padat. Telah tersedia plastik dengan berbagai daya adsorpsi.

Enzim dapat memberikan keuntungan karena enzim yang berikatan dengan Ab berlabel dapat memberikan signal, dimana molekul enzim dapat membentuk beberapa molekul substrat menjadi produk yang dapat terdeteksi. Enzim dapat digunakan untuk menghasilkan produk berwarna dari substrat tidak berwarna, sehingga produk dapat dianalisa dengan mudah menggunakan spektrofotometer atau *colorimeter*.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Penyakit demam berdarah dengue (DBD) merupakan jenis penyakit yang telah tersebar luas diseluruh dunia yang disebabkan oleh virus dengue. Sampai saat ini penyakit demam berdarah dengue (DBD) masih menjadi masalah kesehatan masyarakat Indonesia. Hal ini didukung oleh data-data sebagai berikut : sejak ditemukannya kasus tersebut di Surabaya dan Jakarta pada tahun 1986, angka kejadian penyakit DBD meningkat dan menyebar ke seluruh daerah kabupaten di wilayah Republik Indonesia, angka kematian kasus DBD masih tinggi, terutama penderita yang datang terlambat dengan derajat IV, vektor penyakit DBD nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* masih banyak di jumpai di wilayah Indonesia (Sugiyanto S., 2004).

Sampai saat ini obat demam berdarah dengue (DBD) belum ditemukan (www.infeksi.com/penyakit/penyakitdhdhdbd.html). Pengobatan demam berdarah dengue (DBD) saat ini masih bersifat suportif, yaitu mengatasi kehilangan cairan plasma sebagai akibat peningkatan permeabilitas kapiler dan sebagai akibat perdarahan (www.kompas.com/kompas-cetak/0403/11/humaniora).

Achmad H., dkk (2001) telah melakukan penelitian pada pasien DBD di rumah sakit Syaiful Anwar Malang dengan memberikan kapsul ekstrak jambu biji (*Psidium guajava*. L), hasilnya membuktikan bahwa pemberian kapsul yang mengandung 500 mg ekstrak *Psidium guajava* L. dengan dosis 3x2 kapsul selama 5 hari pada penderita DBD mempunyai hubungan yang bermakna dengan pencapaian jumlah trombosit $\geq 100.000/\text{mm}^3$ pada hari kelima terapi.

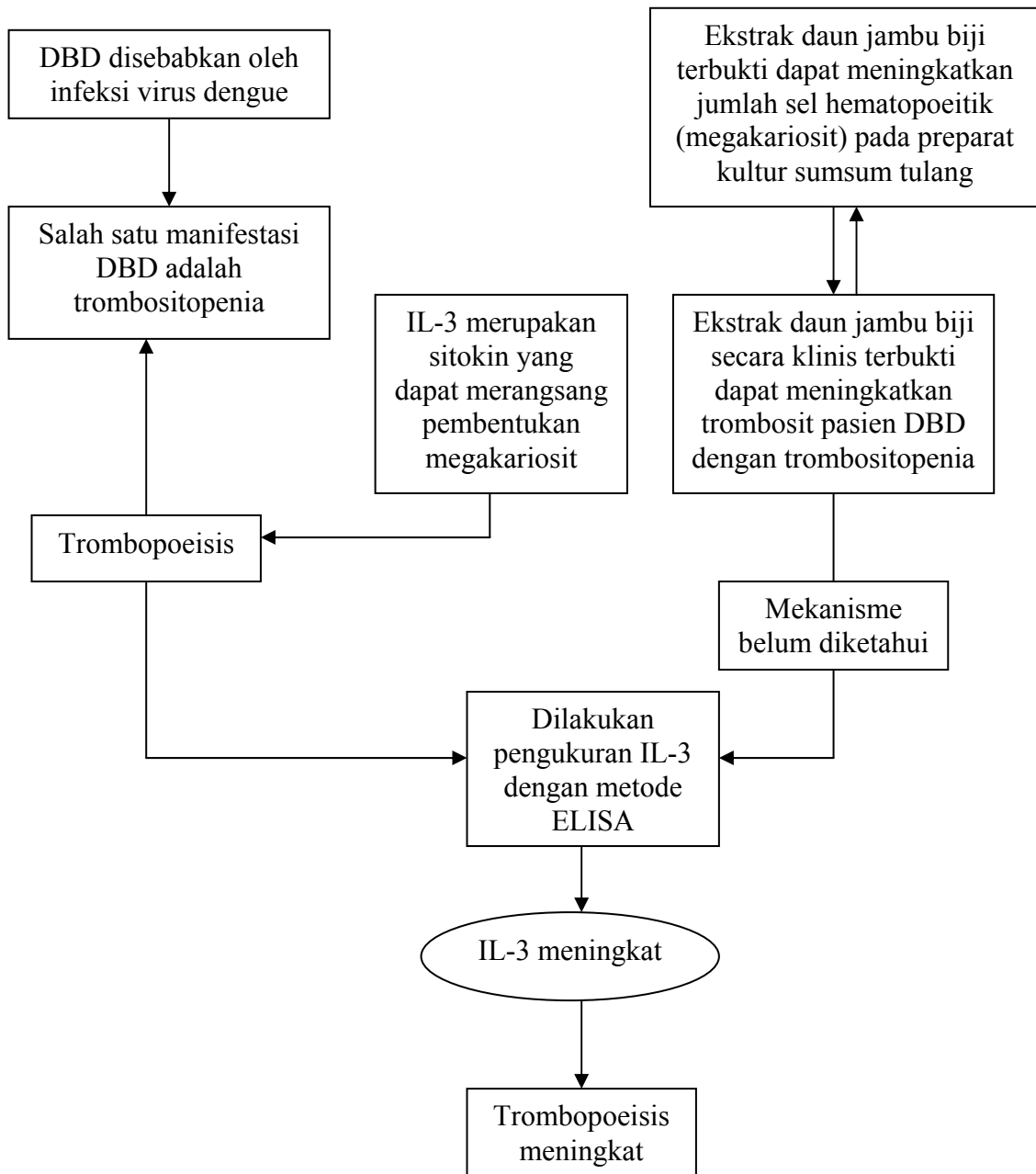
Salah satu patofisiologik demam berdarah dengue (DBD) adalah terjadinya trombositopenia yang merupakan salah satu penyebab terjadinya perdarahan pada DBD, disamping sebab-sebab lainnya seperti kerusakan kapiler, defek koagulasi dan disfungsi trombosit. Trombosit berasal dari sitoplasma megakariosit sumsum tulang dibawah pengaturan mediator humoral trombopoietin. Penelitian sumsum tulang pada pasien DBD menunjukkan adanya

defisit sumsum tulang yaitu tahap hiposeluler pada hari ke 3-4 demam dan perubahan patologis sistem megakariosit (Sugianto D., Tatang K., dkk, 1994).

CSF (*Colony Stimulating Factor*) atau faktor pertumbuhan hematopoietik merupakan sitokin yang merangsang ekspansi dan differensiasi sejumlah *stem cells* (terutama yang berada ditulang belakang) untuk memproduksi trombosit (trombopoeisis), eritrosit, neutrofil, monosit, eosinofil, dan basofil dimana masing-masing sel darah tersebut mempunyai umur yang pendek dalam darah (Oppenheim,J.,J.,1991). Salah satu limfokin yang berperan dalam hematopoeisis adalah IL-3. IL-3 merangsang pertumbuhan dan maturasi sel pluripoten dalam sumsum tulang untuk menghasilkan sel-sel hematopoietik yaitu neutrofil, granulosit, makrofag, eritrosit, dan megakariosit (Tizard R., I., 1995). IL-3 dan GM-CSF juga merangsang pembentukan megakariosit yang merupakan bahan awal dari trombosit (Oppenheim J., J., Ruscetti F., W., Faltynek C.,1991).

Seperti diketahui, jambu biji dapat digunakan untuk mengobati penyakit demam berdarah dengue (DBD), dan telah terbukti bahwa ekstrak daun jambu biji dapat meningkatkan trombosit pada pasien demam berdarah dengue yang disertai trombositopenia. Disamping itu, ekstrak daun jambu biji terbukti dapat meningkatkan jumlah sel hematopoietik terutama megakariosit pada preparat dan kultur sumsum tulang mencit (www.kompas.com/kompas-cetak/0403/11/humaniora). Kuersetin, salah satu senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun jambu biji digunakan sebagai senyawa marker dalam meningkatkan trombosit pasien demam berdarah dengue (DBD).

Dengan uji praklinis diharapkan akan dapat diketahui mekanisme ekstrak daun jambu biji dalam meningkatkan trombosit pasien DBD. Uji praklinis dilakukan dengan menggunakan hewan coba (tikus) yang diberi perlakuan pemberian peroral ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan mediator IL-3. Dimana peningkatan kadar IL-3 berarti akan meningkat pula trombositnya.



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Uji

Pada penelitian ini digunakan bahan uji serbuk simplisia daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang diperoleh dari industri obat tradisional "X".

4.1.2 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Ratus norvegicus*), strain *Wistar* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Tikus tersebut berjenis kelamin jantan, dengan berat badan 200-300 g.

4.1.3 Bahan Kimia

1. CMC-Na
2. Eter
3. Aquadest
4. Kloroform p.a (Merck)
5. Aseton teknis
6. Asam formiat p.a (Merck)
7. Plate KLT silika gel 60 F 254
8. Aquabidest
9. Reagen dalam kit ELISA Mouse IL-3 (Biosource Int, Inc.)
 - a. *mIL-3 Standard*
 - b. *Standard Diluent Buffer*
 - c. *mIL-3 Antibody-Coated Wells* (antibody mIL-3 dalam sumuran)
 - d. *mIL-3 Biotin Conjugate*
 - e. *Streptavidin-Peroksidase (HRP)*
 - f. *Streptavidin-Peroksidase (HRP) diluent*
 - g. *Wash Buffer Concentrate (25x)*

h. Stabilized Chromogen

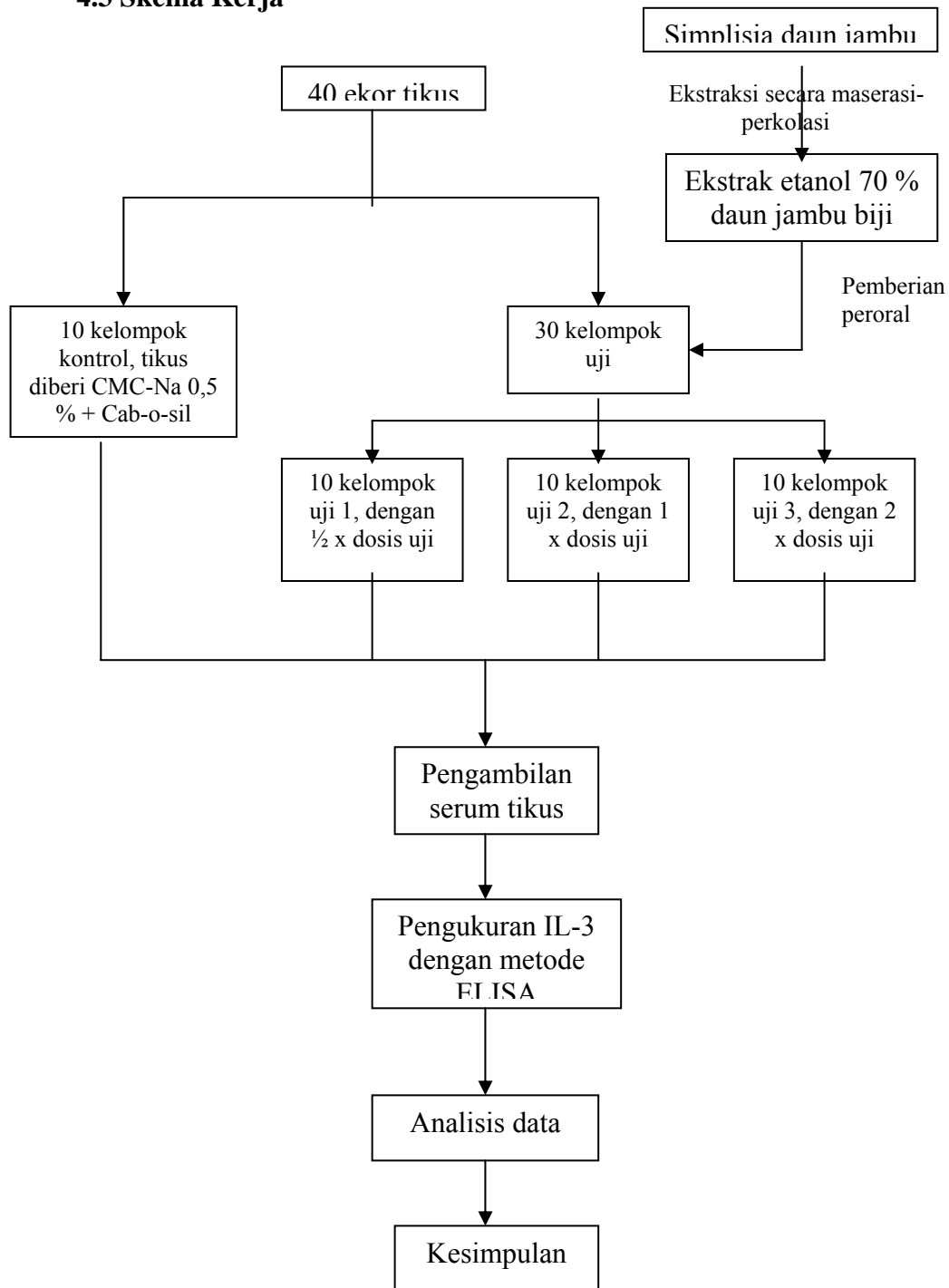
i. Stop Solution

j. Plate Covers

4.2 Alat Penelitian

1. Alat-alat gelas
2. Mikropipet (pipa kapiler)
3. Bejana pengembang untuk KLT
4. KLT densitometer (Camag TLC Scanner 3)
5. Sonde
6. Syringe
7. Peralatan bedah
8. Tabung Venoject 3 ml
9. Socorex
10. Kit ELISA
11. ELISA reader

4.3 Skema Kerja



Gambar 4.1 Skema kerja

4.4 Prosedur Kerja dan Teknik Analisis Data

4.4.1 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi-perkolasi dengan cara sebagai berikut : serbuk simplisia daun jambu biji ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dibasahi dengan etanol 70 %. Simplisia yang sudah terbasahi dengan etanol 70 % dimasukkan dalam perkolator dan ditambah etanol 70 % secukupnya (kira-kira 3-5 cm diatas permukaan simplisia). Perkolator ditutup rapat, dibiarkan selama 24 jam kemudian diteteskan dengan kecepatan 1 ml/menit (filtrat yang ditampung sebanyak 500 ml) kemudian dilakukan penambahan filtrat yang selalu baru tiap kali selesai menampung filtrat. Proses penetasan filtrat dan penambahan etanol 70 % dilakukan sampai etanol 70 % yang ditambahkan kurang lebih 5 liter. Filtrat yang terkumpul dipekatkan dengan rotavapour sampai didapat ekstrak kental dengan volume 500 ml. Ekstrak kental yang didapat dikeringkan dengan penambahan Cab-O-Sil sebanyak 20 gram. Hasil pengeringan ekstrak selanjutnya disebut bulk.

4.4.2 Analisis Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan membandingkan nilai Rf dari standar kuersetin dan sampel serta dengan membandingkan profil spektra dari standar kuersetin dengan sampel.

Cara kerja :

1. Ditimbang sampel bulk sebanyak 25 mg, dilarutkan dalam 1 ml etanol 70 %
2. dilarutkan standar kuersetin secukupnya dalam pelarut etanol.
3. Sampel dan standar ditotolkan pada plate KLT.
4. Dieluasi dengan eluen kloroform : aseton : asam formiat (15 :3,3 : 2,5) dan (9 : 1 : 1).
5. Setelah dieluasi plate KLT dipayar dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm untuk mengetahui adanya noda-noda senyawa.

6. Selanjutnya plate KLT dianalisis pada panjang gelombang 254 nm dan 360 nm, untuk mendapatkan profil kromatogramnya dengan KLT-Densitometer.

4.4.3 Pengukuran Kadar Kuersetin

1. Pembuatan Larutan Baku Induk

Ditimbang standar kuersetin dengan seksama sebanyak 15,0 mg dan dimasukkan dalam labu ukur 5,0 ml dan ditambah metanol sampai tepat tanda, lalu diultrasonik untuk melarutkan.

2. Pembuatan Larutan Baku kerja

Pembuatan larutan baku kerja dilakukan dengan melakukan pengenceran dari larutan baku induk, yaitu :

- i) 250 ppm → 50,0 µl baku induk + 550,0 µl metanol
- ii) 500 ppm → 100,0 µl baku induk + 500,0 µl metanol
- iii) 750 ppm → 150,0 µl baku induk + 450,0 µl metanol
- iv) 1000 ppm → 200,0 µl baku induk + 400,0 µl metanol
- v) 1250 ppm → 250,0 µl baku induk + 350,0 µl methanol

3. Preparasi Sampel

Sampel ekstrak etanol 70 % daun jambu biji ditimbang sebanyak 250,0 mg ditambah metanol 21,0 ml dan 0,6 ml HCl 57 % (v/v). Kemudian dihidrolisis selama 30 menit pada suhu 70° C. Hasil hidrolisis dimasukkan labu ukur 25,0 ml dan ditambah metanol sampai tepat tanda.

4. Pengukuran Kadar Kuersetin

Standar (larutan baku kerja) dan sampel yang sudah dipreparasi ditotolkan sebanyak 2 µl untuk standar dan 10 µl untuk sampel pada plate KLT, kemudian dieluasi dengan fase gerak kloroform, aseton, asam formiat. Plate yang sudah dieluasi, dipayar dengan Densitometer pada panjang gelombang 375 nm.

4.4.4 Perlakuan Pada Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok secara acak dan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor :

1. Kelompok 1 : sebagai kelompok kontrol, tikus diberi CMC-Na 0,5 % dan Cab-O-Sil.
2. Kelompok 2 : sebagai kelompok uji I, tikus diberi ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan dosis $\frac{1}{2}$ x dosis uji (Bulk yang setara dengan 0,067 mg kuersetin/200 g BB tikus).
3. Kelompok 3 : sebagai kelompok uji II, tikus diberi ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan dosis 1 x dosis uji (Bulk yang setara dengan 0,133 mg kuersetin/200 g BB tikus).
4. Kelompok 4 : sebagai kelompok uji III, tikus diberi ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan dosis 2 x dosis uji (Bulk yang setara dengan 0,266 mg kuersetin/200 g BB tikus).

Sediaan uji diberikan sekali sehari pada masing-masing kelompok tikus selama enam hari.

4.4.5 Pengambilan Serum Tikus

- 1) Tikus di bius dengan eter.
- 2) Diambil darah tikus secara intrakardial.
- 3) Dimasukkan kedalam tabung venoject, dan dibiarkan 1-2 jam pada suhu kamar sampai terjadi clotting.
- 4) Disentrifugasi selama 5 menit, kemudian diambil serum dengan spuit dan disimpan dalam freezer (suhu -20°C) sampai dilakukan analisis dengan ELISA.

4.4.6 Pengukuran Optical Density (OD) IL-3

a. Prinsip Pengukuran

Metode yang digunakan untuk mengukur OD IL-3 pada serum tikus adalah ELISA *sandwich* (*Enzyme Linked-Immunesorbent Assay*). Prinsip pengukuran dengan metode ini adalah adanya reaksi antara Ag sampel dan Ab berlabel yang telah dilekatkan pada sumuram (*wells*) mikrotiter Kit ELISA.

Sampel/kontrol yang mengandung IL-3 dipipet dan dimasukkan kedalam sumuran (*wells*), kemudian ditambahkan *Biotin conjugate*. Selama inkubasi pertama, antigen IL-3 serum tikus berikatan dengan Ab monoklonal yang melekat pada dinding dan sebagian larut dalam fase biotin antibodi. Setelah pencucian, ditambahkan enzim *streptavidin peroksidase*. Enzim ini berikatan dengan biotin antibodi untuk membentuk *sandwich* antibodi-antigen-antibodi/enzim terikat dalam mikrotiter.

Setelah inkubasi kedua dan pencucian untuk menghilangkan enzim yang tak terikat, substrat (*Chromogen*) ditambahkan dan substrat (*Chromogen*) ini akan bereaksi dengan enzim yang terikat untuk menghasilkan warna (biru menjadi kuning). Intensitas warna yang dihasilkan sesuai dengan konsentrasi IL-3 pada sampel. Pengukuran kuantitatif konsentrasi IL-3 diperoleh dengan mengukur absorbansi reaksi warna yang dihasilkan menggunakan spektrofotometer mikrotiter reader (*ELISA reader*).

b. Pengenceran Streptavidin-HRP

- 1) Ditentukan jumlah strip (1 strip = 8 sumuran) yang akan digunakan.
- 2) Diencerkan 10 µl larutan konsentrat 100 x *Streptavidin-HRP* dengan 1 ml *Streptavidin-HRP Diluent* untuk masing-masing 8 sumuran yang digunakan untuk analisa. Larutan yang diencerkan ini selanjutnya disebut larutan kerja Streptavidin-HRP.

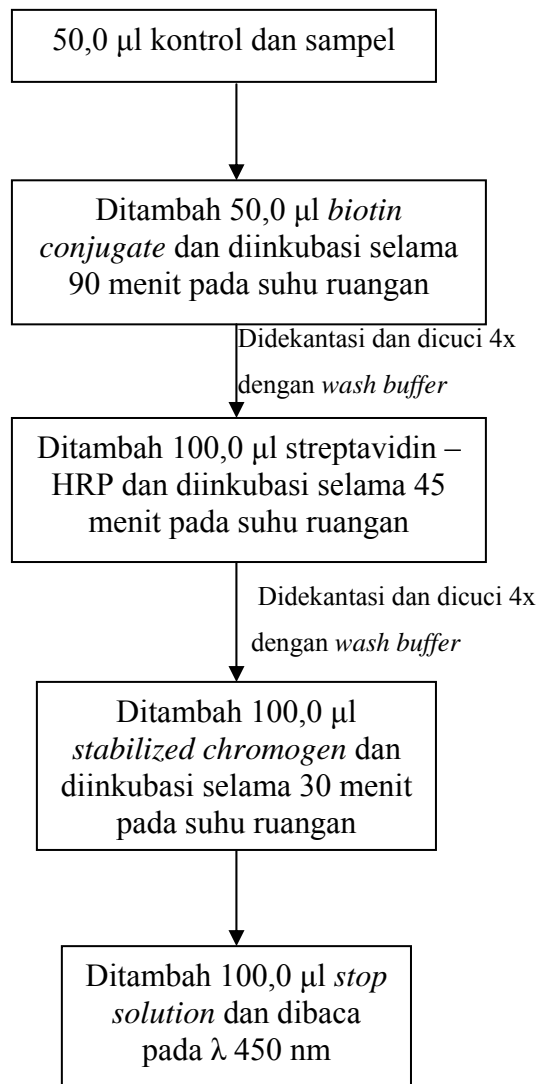
c. Pengenceran *Wash Buffer* (buffer pencuci)

Diambil konsentrat 25x *Wash Buffer* dan diletakkan pada suhu kamar. Kemudian digoyang-goyang sebentar untuk menjamin beberapa endapan garam-garam dapat terlarut kembali. Kemudian diencerkan 1 volume konsentrat 25 x buffer pencuci dengan 24 volume dari aquabidest.

d. Penentuan OD IL-3 dengan ELISA

1. Ditambahkan 50,0 µl standar, sampel, atau kontrol kedalam *microtiter wells*.

2. Ditambahkan 50,0 μ l *Biotin Conjugate* pada setiap *microtiter wells*.
3. *Microtiter* ditutup dengan *plate cover* dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu ruangan.
4. *Microtiter wells* yang berisi standar/sampel/kontrol dicuci dengan cara di dekantasi sebanyak 4 kali dengan *wash buffer*.
5. Ditambahkan 100,0 μ l *Streptavidin–HRP* pada setiap *wells*. *Wells* ditutup dengan *plate cover* dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruangan.
6. *Microtiter wells* yang berisi standar/sampel/kontrol dicuci dengan cara di dekantasi sebanyak 4 kali dengan *wash buffer*.
7. Ditambahkan 100,0 μ l *Chromogen* , warna akan berubah menjadi biru. Kemudian ditutup dengan *plate cover* dan di inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan dan ruang gelap.
8. Ditambahkan 100,0 μ l *Stop solution* pada setiap *wells* dan dibaca OD-nya pada *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.



Gambar 4.2 Pengukuran IL-3 dengan metode ELISA

4.4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan anova pada tingkat kepercayaan 95 %. Analisis anova yang digunakan adalah anova satu arah (*one way anova*) dengan rancangan CRD (*Completely Randomized Design*).

Hipotesis penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut :

Ho : tidak ada perbedaan bermakna harga *optical density* (OD) IL-3 setelah pemberian ekstrak etanol 70 % daun jambu biji antar kelompok perlakuan

Ha : ada perbedaan bermakna harga *optical density* (OD) IL-3 setelah pemberian ekstrak etanol 70 % daun jambu biji antar kelompok perlakuan

Dari hasil perhitungan, apabila didapatkan nilai F hitung lebih besar dari F tabel, maka menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Untuk mengetahui pasangan kelompok perlakuan mana saja yang berbeda dapat dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD).

Adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terhadap IL-3 tikus didapat dengan membandingkan *Optical Density* (OD) IL-3 tikus kelompok perlakuan dengan tikus kelompok kontrol yang hanya diberi CMC-Na 0,5 % dan Cab-O-Sil.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Pembuatan Bahan Uji

Bahan uji dibuat dengan cara mengekstraksi serbuk daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) menggunakan pelarut etanol 70 % secara maserasi-perkolasi.

Tabel V.1 Pembuatan ekstrak etanol 70 % daun jambu biji

Berat serbuk simplisia (g)	Volume total pelarut (L)	Penambahan Cab-O-Sil (g)	Bulk ekstrak (g)	Ekstrak kering (g)
500	5	20	118,6756	98,6756

5.2 Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan nilai Rf dari standar kuersetin dan sampel, pemberian pereaksi penampak noda dan membandingkan profil spektra standar dan sampel.

1) Fase diam : silika gel 60 F 254

Fase gerak : kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25)



Gambar 5.1 Hasil uji KLT dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25)

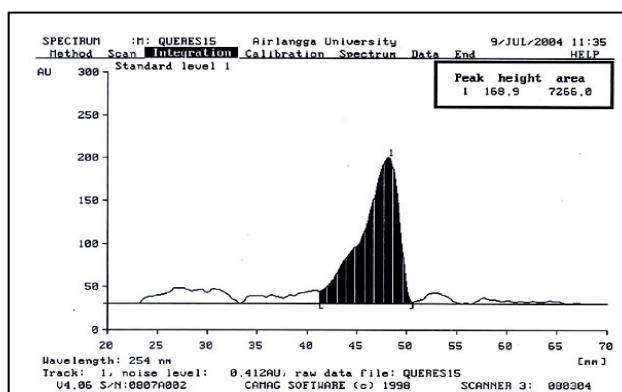
Keterangan :

1. Standar Kuersetin
2. Sampel (ekstrak etanol 70 % daun jambu biji)

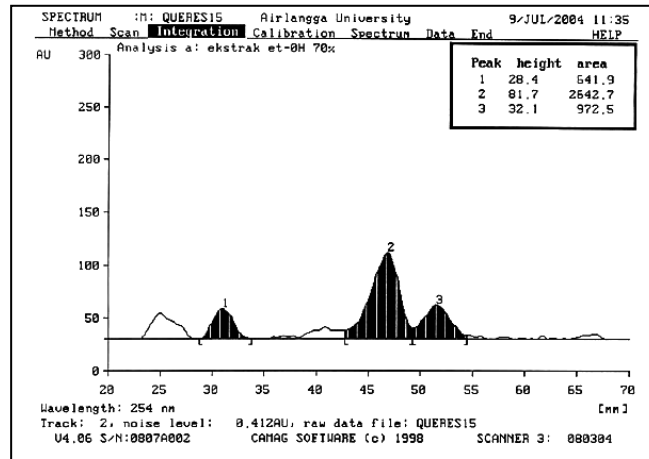
Tabel V.2 Hasil pengamatan kualitatif dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25), diamati pada lampu UV dengan λ 254 nm dan 360 nm

Panjang Gelombang (nm)	Noda	Rf	Warna bercak dengan penampak noda dilihat pada lampu UV 366 nm
254	Standar	0,42	Kuning fluorescen
	Sampel	0,20	Kuning fluorescen
	Sampel	0,40	Kuning fluorescen
360	Sampel	0,46	Kuning fluorescen
	Standar	0,42	Kuning fluorescen
	Sampel	0,20	Kuning fluorescen
	Sampel	0,40	Kuning fluorescen
	Sampel	0,46	Kuning fluorescen

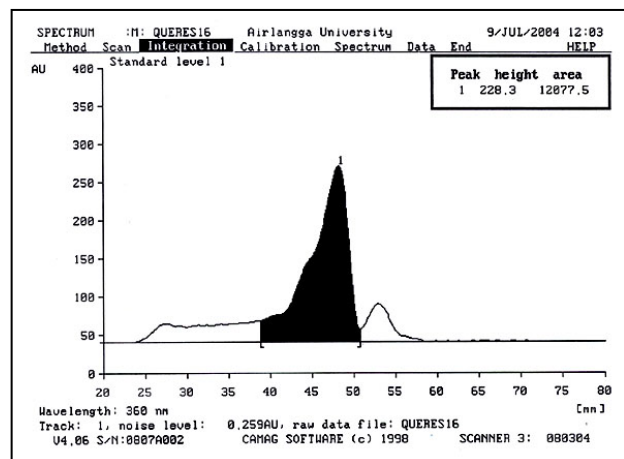
Hasil eluasi yang diperoleh kemudian di payar dengan Densitometer pada λ 254 nm dan λ 360 nm dan didapat hasil sebagai berikut :



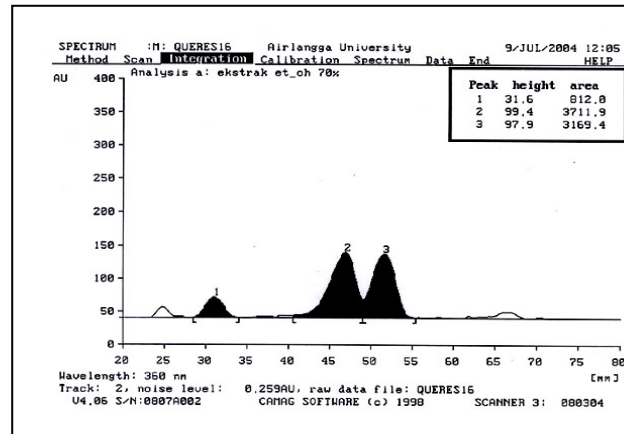
Gambar 5.2 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 254 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) yang diamati dengan alat Densitometer



Gambar 5.3 Profil kromatogram sampel pada λ 254 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) yang diamati dengan alat Densitometer



Gambar 5.4 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 360 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) yang diamati dengan alat Densitometer



Gambar 5.5 Profil kromatogram sampel pada λ 360 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) yang diamati dengan alat Densitometer

2) Fase diam : silika gel 60 F 254

Fase gerak : kloroform : aseton : asam formiat (9 : 1 : 1)



Gambar 5.6 Hasil uji KLT dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1)

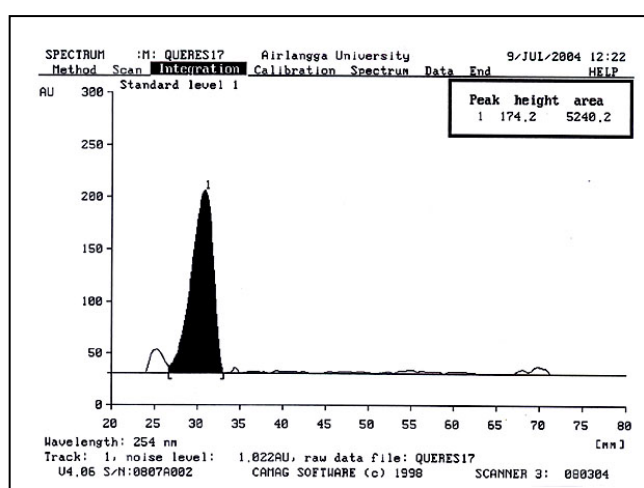
Keterangan:

1. Standar kuersetin
2. Ekstrak etanol 70% daun jambu biji

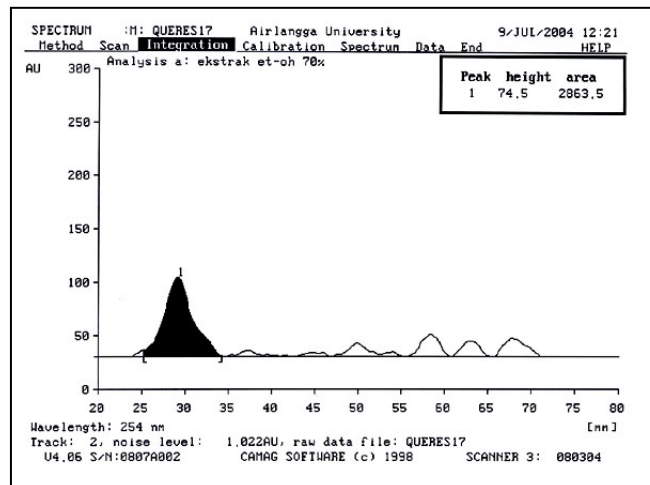
Tabel V.3 Hasil pengamatan kualitatif dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1), diamati pada lampu UV dengan λ 254 nm dan 360 nm

Panjang Gelombang (nm)	Noda	Rf	Warna bercak dengan penampak noda dilihat pada lampu UV 366 nm
254	Standar	0,20	Kuning fluorescen
	Sampel	0,18	Kuning fluorescen
360	Standar	0,20	Kuning fluorescen
	Sampel	0,18	Kuning fluorescen

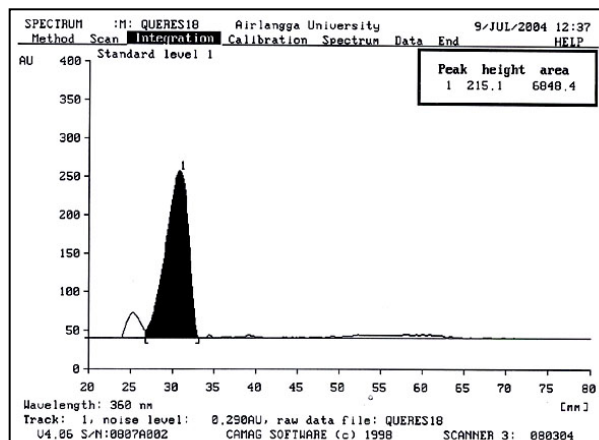
Hasil eluasi yang diperoleh kemudian di payar dengan Densitometer pada λ 254 nm dan λ 360 nm dan didapat hasil sebagai berikut :



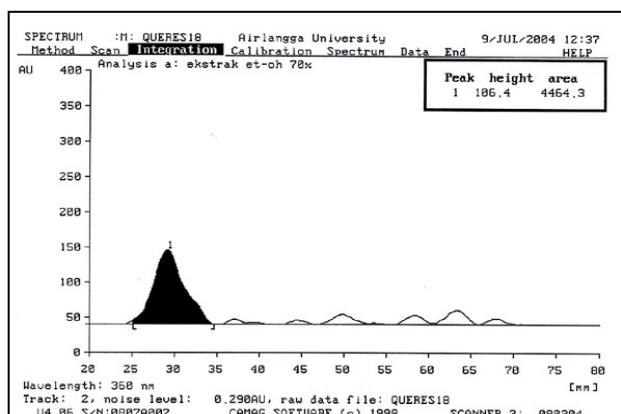
Gambar 5.7 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 254 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9 : 1 : 1) yang diamati dengan alat Densitometer



Gambar 5.8 Profil kromatogram sampel pada λ 254 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9 : 1 : 1) yang diamati dengan alat Densitometer



Gambar 5.9 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 360 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9 : 1 : 1) yang diamati dengan alat Densitometer



Gambar 5.10 Profil kromatogram sampel pada λ 360 nm dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9 : 1 : 1) yang diamati dengan alat Densitometer

5.3 Penetapan Kadar Kuersetin

Hasil penetapan kadar kuersetin dalam bahan uji (bulk ekstrak etanol 70% daun jambu biji) dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel V.4 Kadar kuersetin dalam ekstrak etanol 70% daun jambu biji

No	Berat bulk ekstrak (mg)	Peak area noda ($\lambda = 375\text{nm}$)	Kadar dalam bulk (%)
1	250,1	9696,8	2,47
2	249,7	9582,3	2,45
3	249,4	9661,1	2,47
4	250,2	9661,1	2,45
5	250,0	9704,7	2,47
Rata-rata			2,46
Standar Deviasi (SD)			0,01

5.4 Perhitungan Dosis dan Pembuatan Sediaan Per Oral

Berdasarkan hasil studi klinis yang telah dilakukan oleh Harijono Achmad pada pasien demam berdarah di RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang, pemberian ekstrak dilakukan sebanyak 2 kapsul (tiap kapsul mengandung 500 mg ekstrak).

- Tiap 500 mg ekstrak kering (bulk) mengandung kuersetin sebesar 2,65 mg
- Dosis yang dipakai = $2 \times 2,65 \text{ mg} = 5,31 \text{ mg}$ kuersetin per 50 kg berat badan manusia

Selanjutnya dosis ini dikonversikan ke tikus dengan nilai konversi 0,025 untuk tikus dengan berat badan 200 g.

Nilai konversi dosis untuk tikus:

- Dosis kuersetin untuk tikus dengan BB 200 g = $0,025 \times$ dosis untuk manusia BB 50 kg
- Dosis kuersetin untuk tikus = $0,025 \times 5,31 \text{ mg}$
= $0,133 \text{ mg}/200 \text{ g}$ BB tikus

Pada penelitian ini digunakan tiga macam dosis yang berbeda, yaitu $\frac{1}{2}$ x, 1 x, dan 2 x dosis diatas, sehingga diperoleh :

- Dosis 1 (setengah kali dosis) = $0,067 \text{ mg kuersetin}/200 \text{ g}$ BB tikus
- Dosis 2 (satu kali dosis) = $0,133 \text{ mg kuersetin}/200 \text{ g}$ BB tikus
- Dosis 3 (dua kali dosis) = $0,266 \text{ mg kuersetin}/200 \text{ g}$ BB tikus

Dari ekstrak etanol 70 % daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang dibuat yang akan digunakan sebagai bahan uji , mengandung kuersetin sebesar 2,46 %.

Dengan demikian dosis yang diberikan pada tikus adalah :

- Dosis 1 = $0,067/2,46 \times 100 \text{ mg} = 2,724 \text{ mg bulk}/200 \text{ g}$ BB tikus
- Dosis 2 = $0,133/2,46 \times 100 \text{ mg} = 5,407 \text{ mg bulk}/200 \text{ g}$ BB tikus
- Dosis 3 = $0,266/2,46 \times 100 \text{ mg} = 10,813 \text{ mg bulk}/200 \text{ g}$ BB tikus

Untuk membuat sediaan yang akan diberikan secara per oral pada tikus, ekstrak etanol 70 % daun jambu biji (bulk) dengan tiga macam dosis yang berbeda tersebut masing-masing dibuat suspensi dalam CMC Na.

5.5 Pengukuran Optical Density (OD) Interleukin 3

Data *Optical Density* (OD) dari Interleukin 3 sampel serum tikus, berbagai dosis pada kelompok uji dan kelompok kontrol dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel V.5 Rekapitulasi data optical density (OD) Interleukin-3 sampel serum tikus dengan metode ELISA

Hewan coba (tikus)	OD pada $\lambda = 450 \text{ nm}$			
	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
1	0,075	0,069	0,082	0,076
2	0,098	0,076	0,079	0,086
3	0,108	0,077	0,081	0,083
4	0,102	0,075	0,079	0,088
5	0,086	0,079	0,080	0,076
Total	0,469	0,376	0,401	0,409
Rata-rata	0,094	0,075	0,080	0,082

Keterangan :

Kelompok I : kontrol (CMC Na 0,5%)

Kelompok II : dosis 1 (0,067 mg kuersetin / 200 g BB tikus)

Kelompok III : dosis 2 (0,133 mg kuersetin / 200 g BB tikus)

Kelompok IV : dosis 3 (0,266 mg kuersetin / 200 g BB tikus)

Setelah didapatkan data OD dari masing-masing kelompok tikus, dilakukan analisis dengan menggunakan *anova* satu arah dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel V.6 Hasil uji anova satu arah ($\alpha = 0,05$) dari data OD Interleukin-3

Sumber variasi	Jumlah kuadrat (SS)	Derajat bebas (df)	Kuadrat rata-rata (MS)	F hitung	Sig.
Antar dosis	0,001	3	0,000	5,593	0,008
Antar perlakuan	0,001	16	0,000		
Total	0,002	19			

Dari perhitungan Anova diketahui bahwa signifikansi 0,007 berarti lebih kecil dari 0,05, sehingga dapat disimpulkan minimal ada satu pasang kelompok yang mempunyai perbedaan bermakna. Perhitungan dilanjutkan dengan uji LSD yang hasilnya dapat dilihat pada tabel V.7.

Tabel V.7 Hasil uji LSD antar kelompok dari data OD Interleukin 3

	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
Kelompok I		0,01860* S = 0,001	0,01360* S = 0,011	0,01200* S = 0,022
Kelompok II			0,00500 S = 0,305	0,00660 S = 0,181
Kelompok III				0,00160 S = 0,739
Kelompok IV				

Keterangan :

- Kelompok I : kontrol (CMC Na 0,5%)
- Kelompok II : dosis 1 (0,067 mg kuersetin / 200 g BB tikus)
- Kelompok III : dosis 2 (0,133 mg kuersetin / 200 g BB tikus)
- Kelompok IV : dosis 3 (0,266 mg kuersetin / 200 g BB tikus)
- Angka pertama menunjukkan angka perbedaan rata-rata
- Tanda * menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok pada kolom dan lajur tersebut
- Huruf S menunjukkan harga signifikan antar kelompok pada kolom dan lajur

BAB VI

PEMBAHASAN

Penyakit demam berdarah dengue, di Indonesia masih menjadi masalah kesehatan yang cukup serius. Sampai saat ini obat demam berdarah belum ditemukan, pengobatan demam berdarah dengue saat ini masih bersifat suportif. Jambu biji (*Psidium guajava* L.) merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai macam penyakit salah satunya adalah demam berdarah. Telah banyak pengalaman yang membuktikan bahwa penderita demam berdarah dengue dapat sembuh setelah menggunakan jus buah jambu biji, khususnya buah yang warna daging buahnya merah. Namun, belum diketahui secara pasti senyawa apa yang berkhasiat untuk mengatasi demam berdarah tersebut dan bagaimana mekanisme penyembuhannya.

Dari studi klinis yang telah dilakukan oleh Harijono Achmad di RS Syaiful Anwar Malang membuktikan bahwa pemberian kapsul yang mengandung 500 mg ekstrak *Psidium guajava* L. dengan dosis 3 x 2 kapsul selama 5 hari pada penderita demam berdarah dengue dapat meningkatkan jumlah trombosit $\geq 100.000/\text{mm}^3$. Dari penelitian sebelumnya juga telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dapat meningkatkan jumlah sel hematopoietik terutama megakariosit pada preparat dan kultur sumsum tulang mencit yang berarti dapat meningkatkan trombosit pada mencit.

Daun jambu biji mengandung berbagai macam zat berkhasiat untuk mengatasi penyakit demam berdarah dengue baik dengan cara menghambat replikasi virus dengue maupun dengan cara meningkatkan trombosit pada pasien demam berdarah dengue. Salah satu kandungan dalam daun jambu biji adalah kuersetin, kuersetin merupakan salah satu senyawa flavonoid yang dapat menghambat aktivitas enzim *reverse transcriptase* yang berarti dapat menghambat pertumbuhan virus berinti RNA. Di samping itu kuersetin juga berperan dalam sistem imun yakni sebagai immunomodulator dan proses sekresi sitokin.

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan pengaruh pemberian ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terhadap sekresi interleukin-3 pada tikus untuk mengetahui mekanisme kerjanya pada trombopoiesis. Proses ekstraksi daun jambu biji dilakukan dengan menggunakan metode campuran yaitu maserasi-perkolasi. Dari 500 gram simplisia daun jambu biji dan pelarut etanol 70 % sebanyak 5 liter didapatkan bulk sebanyak 118, 6756 gram setelah dilakukan penambahan Cab-O-Sil sebanyak 20 gram untuk mengeringkannya. Cab-O-Sil dipilih karena dapat mengabsorpsi air dalam jumlah yang cukup besar.

Ekstrak etanol 70 % daun jambu biji yang didapat terlebih dahulu di uji KLT dengan membandingkan nilai Rf dari standar kuersetin dengan sampel dan membandingkan profil spektra standar kuersetin dan sampel dengan menggunakan KLT-densitometri. Tujuan uji KLT ini adalah untuk mengetahui profil kandungan ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dan untuk mengetahui adanya senyawa kuersetin didalam bahan uji yang digunakan sebagai senyawa marker untuk menghitung dosis bahan uji. Digunakan beberapa macam eluen yang diperkirakan bisa memisahkan senyawa yang ada dalam ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan baik (tidak ada noda yang menumpuk). Pemilihan eluen didasarkan pada polaritas eluen dan senyawa yang ingin ditarik. Dalam hal ini, senyawa yang ingin ditarik adalah kuersetin yang bersifat semipolar. Eluen atau fase gerak yang digunakan adalah kloroform : aseton : asam formiat dengan perbandingan 150 : 33 : 25 (v/v) dan perbandingan 9 : 1 : 1 (v/v).

Dari hasil uji KLT ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25) didapatkan nilai Rf standar kuersetin 0,42 dan nilai Rf sampel 0,20 ; 0,40 ; dan 0,46. Nilai Rf standar kuersetin dan sampel hampir sama yaitu 0,42 dan 0,40, jadi diduga bahwa dalam sampel ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terdapat kuersetin. Pada fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (9:1:1) didapatkan nilai Rf standar kuersetin 0,20 dan sampel 0,18. nilai Rf standar kuersetin dan sampel hampir sama, jadi diduga bahwa dalam ekstrak etanol 70 % daun jambu biji terdapat kuersetin.

Penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol 70 % dilakukan dengan cara analisis KLT-Densitometri. Pada penelitian ini didapatkan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol 70 % daun jambu biji sebesar 2,46 % yang artinya dalam 100

mg ekstrak terdapat kuersetin sebanyak 2,46 mg. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Ratus norvegicus*) strain wistar dan berjenis kelamin jantan. Hewan coba ini dapat menunjukkan variasi respon biologis meskipun berasal dari strain yang sama, oleh karena itu jenis kelamin, umur, lingkungan hidup dan makanannya diusahakan sama.

Perhitungan dosis untuk sediaan peroral pada penelitian ini didasarkan pada studi klinis yang telah dilakukan oleh Dr. Suprpto Ma'at terhadap pasien demam berdarah dengue di RS Petrokimia Gresik. Pemberian ekstrak daun jambu biji dilakukan sebanyak 2 kapsul. Tiap kapsul mengandung 500 mg ekstrak. Tiap 500 mg ekstrak mengandung kuersetin sebanyak 2,65 mg. Jadi dosis yang dipakai adalah $2 \times 2,65 \text{ mg} = 5,31 \text{ mg}$ kuersetin per 50 kg berat badan manusia. Selanjutnya dosis ini dikonversikan pada tikus dengan nilai konversi 0,025 untuk tikus dengan berat badan 200 gram. Jadi dosis kuersetin untuk tikus adalah 0,133 mg/BB tikus. Dari ekstrak etanol 70 % daun jambu biji yang dibuat yang akan digunakan sebagai bahan uji, mengandung kuersetin sebesar 2,46 %.

Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok uji. Untuk kelompok uji, tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu : tikus dengan $\frac{1}{2}$ x dosis uji, 1 x dosis uji, dan 2 x dosis uji. Dengan demikian dosis yang diberikan pada tikus adalah : untuk dosis $\frac{1}{2}$ x dosis uji = 2,724 mg bulk/200 g BB tikus, dosis 1 x dosis uji = 5,407 mg bulk/200 g BB tikus, dan dosis 2 x dosis uji = 10,813 mg bulk/200 g BB tikus. Sedangkan untuk kelompok kontrol tikus diberi CMC-Na 0,5 % dan Cab-O-sil.

Pada pembuatan larutan uji, bahan uji yakni ekstrak etanol 70 % daun jambu biji ditambah dengan larutan CMC-Na 0,5 %. Larutan CMC-Na 0,5 % berfungsi sebagai bahan pensuspensi. Penggunaan bahan pensuspensi ini tidak menunjukkan efek peningkatan interleukin 3 pada tikus sehingga tidak menyebabkan hasil positif palsu.

Pengukuran interleukin 3 dilakukan dengan metode ELISA. Prinsip pengukuran dengan metode ini adalah adanya reaksi antigen (Ag) sampel dan antibodi (Ab) berlabel yang telah dilekatkan pada sumuran (wells) dalam mikrotiter kit ELISA. ELISA menggunakan indikator enzim sebagai label. Sebanyak 50,0 μ l serum dimasukkan dalam sumuran pada mikrotiter kit ELISA.

Pada tahapan ini terjadi reaksi antara Ag dari serum dan Ab dalam sumuran mikrotiter kit ELISA. Selanjutnya dilakukan penambahan *Biotin konjugat* sebanyak 50,0 µl, , diinkubasi selama 90 menit, didekantasi dan dicuci dengan *wash buffer* sebanyak 4 kali. Fungsi dari penambahan biotin ini adalah untuk memperpanjang reaksi Ag dan Ab. Selanjutnya dilakukan penambahan *streptavidin-HRP* sebanyak 100,0 µl, diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruangan. HRP (*horse radish peroksidase*) merupakan enzim yang digunakan sebagai indikator terbentuknya ikatan Ab-Ag-Ab/enzim yang selanjutnya dapat diukur. Streptavidin sendiri merupakan antibodi yang didapat dari hewan yang berbeda spesiesnya.

Setelah inkubasi yang kedua, didekantasi dan dicuci 4 kali dengan *wash buffer*, tujuannya untuk menghilangkan kelebihan *streptavidin-HRP* yang tidak terikat. Selanjutnya ditambah kromogen 100,0 µl diinkubasi 30 menit pada tempat yang gelap dan terakhir ditambah dengan *stop solution* sebanyak 100,0 µl. Kromogen akan bereaksi dengan enzim yang terikat menghasilkan warna (biru menjadi kuning). Intensitas warna yang dihasilkan sesuai dengan konsentrasi interleukin 3 pada sampel. *Stop solution* ditambahkan dengan tujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi dan untuk menghindari perubahan warna yang lebih gelap oleh paparan sinar matahari.

Pengukuran kuantitatif konsentrasi interleukin 3 diperoleh dengan mengukur absorban reaksi warna yang dihasilkan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Prinsip ELISA reader adalah spektrofotometri. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 450 nm dikarenakan warna yang terbentuk oleh substrat kromogen (mengandung tetrametilbenzidine/TMB) memberikan resapan didaerah sinar tampak (λ 380-780 nm).

Dari hasil pengukuran interleukin 3 dengan ELISA reader didapat *optical density* (OD) dari kelompok kontrol dan kelompok uji. Rata-rata harga OD kelompok kontrol yaitu 0,094 dan kelompok uji dengan $\frac{1}{2}$ dosis uji 0,075, kelompok uji dengan 1 x dosis uji 0,080 dan kelompok uji dengan 2 x dosis uji 0,082. Selanjutnya harga OD kelompok kontrol dan kelompok uji ini dianalisis dengan anava satu arah (*one way anova*) dengan rancangan CRD pada derajat kepercayaan 95 %, diperoleh harga signifikan lebih kecil 0,05 yaitu 0,008.

Dengan demikian dapat diambil kesimpulan bahwa ada perbedaan bermakna antara satu pasang kelompok atau lebih. Untuk mengetahui secara pasti kelompok mana yang mempunyai perbedaan bermakna maka uji tersebut dilanjutkan dengan uji LSD.

Dari hasil analisis LSD dapat disimpulkan ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok uji dosis 1, kelompok kontrol dengan kelompok uji dosis 2 dan kelompok kontrol dengan kelompok uji dosis 3. Harga OD IL-3 kelompok uji dengan dosis 1/2x, 1x, dan 2x dosis uji lebih kecil dari harga OD IL-3 kelompok kontrol. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa peningkatan trombosit oleh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji pada pasien DBD tidak melalui mekanisme peningkatan interleukin 3.

CSF (*Colony stimulating factor*) atau faktor pertumbuhan hematopoietik aksinya dipengaruhi oleh sitokin yang lain seperti TNF, LT, IFN- γ , dan TGF- β yang menghambat pertumbuhan sel progenitor sumsum tulang, serta IL-1 dan IL-6 yang meningkatkan respon dari CSF. Dari hasil penelitian sebelumnya terbukti bahwa ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dapat meningkatkan GM-CSF dan IL-6 pada tikus yang berarti meningkat pula jumlah trombositnya. Jadi, penurunan IL-3 oleh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji diperkirakan untuk mekanisme homeostasis dalam tubuh. Sebab apabila peningkatan GM-CSF dan IL-6 tidak diimbangi oleh penurunan IL-3 maka akan terjadi peningkatan trombosit yang berlebihan sehingga menyebabkan trombositosis. Sedangkan apabila penurunan IL-3 berlebihan maka akan mengakibatkan terjadinya penurunan jumlah komponen-komponen darah yang lain seperti eritrosit, neutrofil, granulosit, makrofag dan megakariosit yang berbahaya juga bagi tubuh.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka untuk penelitian lebih lanjut disarankan melakukan penelitian mengenai mekanisme lain ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dalam meningkatkan trombosit pada pasien DBD. Selain itu perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa apa yang berkhasiat dalam peningkatan trombosit pada pasien DBD oleh ekstrak etanol 70 % daun jambu biji.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

Dari penelitian pengaruh pemberian ekstrak etanol 70 % daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap interleukin 3 pada tikus dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dengan 3 macam dosis uji yaitu 0,067 mg kuersetin/200 g BB tikus; 0,133 mg kuersetin/200 g BB tikus; dan 0,266 mg kuersetin/200 g BB tikus tidak dapat meningkatkan kadar interleukin 3 pada tikus.

7.2 SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme lain ekstrak etanol 70 % daun jambu biji dalam meningkatkan trombosit pada pasien DBD yang disertai trombositopenia. Selain itu perlu penelitian lebih lanjut mengenai senyawa apa yang berkhasiat dalam meningkatkan trombosit pasien demam berdarah dengue (DBD).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad H.dkk., 2001, Pengaruh Pemberian Ekstrak Psidium guajava Terhadap Jumlah Trombosit pada Penderita Demam Berdarah Dengue di Bangsal Rawat Inap Penyakit Dalam RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, **Jurnal dalam Majalah Kedokteran Unibraw**, Vol. XVII, No. 1, April, 2001.
- Ade, N., Agustina, R., Amin, F., 2001. LKTI. **Ekstrak Jambu Biji (Psidium guajava L.) Untuk Meningkatkan Jumlah Trombosit Penderita Demam Berdarah**, Universitas Negeri Semarang, hal. 1-23.
- Anonim, 1995, **Farmakope Indonesia**, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 1977, **Materia Medika Indonesia**, Jilid I, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim, 2000, **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**, Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal: 5 – 12.
- Anonim, 2004. Ekstrak Daun Jambu Biji Berpotensi Sembuhkan Demam Berdarah. Available at : www.kompas.com/kompas-cetak/0403/11/humaniora. Accessed Juny 1, 2004.
- Anonim, 2004. Ekstrak Daun Jambu Biji Bisa Mengatasi DBD. Available at : www.infeksi.com/penyakit/penyakitdhfdbd.html. Accessed April 16, 2004.
- Anonim, Patogenesis. Accessed at : www.depkes.go.id/downloads/Tata. Accessed April 16, 2004.
- Anonim, Quercetin. Available at : www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrug_profiles/nutsupdrugs/que. Accessed Juny 1, 2004.
- Anonim, Quercetin Derivatives. Available at : www.ic-network.com/hardbook/querctin.html. Accessed July 25, 2004.
- Anonim, Chronic Prostatitis and Quercetin Primer. Available at : www.chronicprostatitis.com/qfacts.html. Accessed 2003.
- Baldy, C., 1995. Pembekuan. Dalam : Price, S., Wilson, L., **Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit**. Edisi 4. Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 264-275.

- Baratawidjaja Karnen G., 1991. **Imunologi Dasar**. Edisi kedua. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.
- Bellanti, Joseph. A., 1993. **Immunologi**, Edisi III, Yogyakarta : Gajah Mada University Press, hal. 173-188.
- Burgess, Graham, W., 1995. **Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian**. Indonesian edition, Yogyakarta : Gajahmada Univercity Press.
- Clancy, John. Jr., 2000. **Basic Consepts in Immunology : A Student's Survival Guide**, International Edition, New York : Mc. Graw-Hill, p. 1-25.
- Harborne J.,B., 1999. **Phytochemical Dictionary A Handbook of Bioactive Compaunds From Plants**, Second Edition. Taylor and Francis ltd.
- Hargono Djoko, 2003, Beberapa Hasil Penelitian yang Mendukung Manfaat Tumbuhan Jambu Biji (Psidium guajava L.), **Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia**, Vol.1 No.1, April, 2003, hal : 33-38.
- Hendarwanto, Gotera W., Zulkarnain I., 1994. **Tinjauan Klinis dan Epidemiologis Demam Berdarah dengue pada Pasien Dewasa di UPF**. Proceeding Konas PETRI. In press.
- Ismoedijano, 2002. Tatalaksana Demam dengue dan Sindroma Syok Dengue. **Majalah Kedokteran Tropis Indonesia**, Vol. 13, No. 2.
- Kho, L., Leman, H., Choeswati, S., himawan, T., 1984. Antibodi Trombosit pada Demam Berdarah, **Medika Jurnal Kedokteran dan Farmasi**, No. 8, Th. 10, hal. 593-4.
- Murgue, B., Cassar, O., Guigon, M., Chungue, E., 1997. **Dengue Virus Inhibits Human Hematopoietic Progenitor Growth In Vitro**. J. infect Dis. Jun 175 :1497-1501.
- Novriani, N., 2002. Respon Imun dan Derajat Kesakitan Demam Berdarah Dengue dan Dengue Syok Syndrome. **Cermin Dunia Kedokteran**, No. 134.
- Oppenheim, J. J., Ruscetti, F. W., Faltynek, C., 1991. Cytokines. In : sites, D.P., Terr, A. I (Eds). **Basic and Clinical Immunology**. Ed 7th, London : Prentice Hall International Inc. pp.78-99.
- Purwantiningsih, Wahyono Djoko, Artomo Wayan T., 1999. Antibodi Monoklonal Terhadap Antigen Virus Dengue-3. **Majalah Farmasi Indonesia**, Vol. 10, No. 3.

- Rampengan, T. H., 1985. Pengelolaan Penderita Demam Berdarah Dengue. **Medika Jurnal Kedokteran dan Farmasi**, No. 80, Th. 12, hal. 708-712.
- Remick, D.G., Friedland, J. S., 1997. **Cytokines in Health and Diseases**. Second Edition, Marcel Dekker Inc.
- Rukmana R., 1996, **Jambu Biji**, Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Sri Rejeki, H.H., Hindra Irawan, S., 2002. **Demam Berdarah Dengue, Naskah Lengkap : Pelatihan Bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak & Dokter Spesialis Penyakit Dalam dalam Tatalaksana Kasus DBD**, Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Sugianto, D., Tatang, K., 1994. Perubahan Jumlah Trombosit pada Demam Berdarah Dengue. **Cermin Dunia Kedokteran**, No. 92. hal. 14-17.
- Sugiyanto, S., 2004. **Demam Berdarah Dengue Tinjauan dan Temuan Baru Diera 2003**. Surabaya : Airlangga Univercity Press.
- Tizard, R.I., 1995. **Immunology An Introduction**. Fourth edition. Sounders Collega Publishing, p. 164-165dhfdbd.htm.

Lampiran 1

Sertifikat Serbuk Simplisia Daun Jambu Biji

INDUSTRI OBAT TRADISIONAL



Kantor
 Alamat : Jl. Manggis Timur No. 11
 Gresik, Jawa Timur
 Telepon : (031) 3984554, (031) 3975122

Facsimile : (031) 3984554
 E-mail : tradimun@yahoo.com

LAPORAN PEMERIKSAAN

Nama sediaan : Psidium folium
 Asal simplisia : Agronomi
 Tanggal penerimaan : 31 maret 2003
 Tanggal pemeriksaan : 10-12 April 2003
 Pustaka : MML, 1977

No. PEMERIKSAAN	SPESIFIKASI/ SYARAT	HASIL
1. PEMERIAN <ul style="list-style-type: none"> • Bau • Rasa • Warna 	Khas aromatik Kelat Hijau keabu-abuan	Khas aromatik Kelat Hijau keabu-abuan
2. IDENTIFIKASI warna, 2 mg serbuk + 5 tetes H ₂ SO ₄ (P) + 5 tetes H ₂ SO ₄ 10N (P) + 5 tetes HCl (P) + 5 tetes Amonia 25%	Coklat Kuning kehijauan Kuning kehijauan Kuning kehijauan	Coklat Kuning kehijauan Kuning kehijauan Kuning kehijauan

Dengan ini menyatakan serbuk yang dikirim ke Fakultas Farmasi Universitas Airlangga untuk penelitian tentang demam berdarah berasal dari simplisia Psidium Folium.

Mengetahui,

(Ortophono Maar)

Lampiran 2

Tabel Perbandingan Luas Permukaan Tubuh Beberapa Hewan Coba dan Manusia

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg	Manusia 50 kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	124,2	387,9	277,1
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	17,8	56,0	39,9
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	10,2	31,5	22,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	4,5	14,2	10,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	1,0	3,1	2,2
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,32	1,0	0,07
Manusia 50 kg	0,0036	0,025	0,043	0,10	0,45	1,4	1,0

Dikutip dari :

Gosh, M.N., 1971. *Fundamentals of Experimental Pharmacology*, Calcutta : Scientific Book Agency

Keterangan :

Untuk menentukan dosis absolut bagi suatu spesies yang tercantum dalam kolom, dosis absolut spesies yang dicantumkan dalam lajur dikalikan dengan factor yang terdapat pada irisan kolom dan lajur yang sesuai.

Lampiran 3

Tabel Volume Maksimum dari Obat yang Diberikan Kepada Binatang Percobaan

Binatang	Volume maksimum (ml)				
	Intra vena	Intra muskular	Intra peritoneal	subcutan	Per oral
Mencit (20-30 g)	0,5	0,05	1,0	0,5 – 1,0	1,0
Tikus (100 g)	1,0	0,1	2,0 – 5,0	2,0 – 5,0	5,0
Tupai (50 g)	-	0,1	1,0 – 2,0	2,5	2,5
Marmot (250 g)	-	0,25	2,0 – 5,0	5,0	10,0
Merpati (300 g)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2,5 kg)	5,0 - 10,0	0,5	10,0 – 20,0	5,0 – 10,0	20,0
Kucing (3 kg)	5,0 - 10,0	1,0	10,0 – 20,0	5,0 – 10,0	50,0
Anjing (5 kg)	10,0 - 20,0	5,0	20,0 – 50,0	10,0	100,0

Dikutip dari :

Ritschel, W.A., 1974. *Laboratory Manual of Biopharmaceutis and Pharmacokinetics*. Drug Intelligence Publications, Inc.

Keterangan :

Pada umumnya volume yang diberikan setengah kali volume maksimum

Lampiran 4

Pembuatan Kurva Baku untuk Penetapan Kadar Kuersetin dalam Bahan Uji

- 1) Pembuatan larutan baku induk
 Penimbangan standar kuersetin = 15,2 mg
 Standar kuersetin tersebut ditambah metanol sampai 5,0 ml sehingga diperoleh kadar larutan baku induk = 3040 ppm.
- 2) Pembuatan larutan baku dengan berbagai konsentrasi dari larutan baku induk di atas dan diukur area puncaknya secara KLT Densitometri pada $\lambda = 375$ nm. Selanjutnya dibuat kurva baku antara kadar vs area puncak, sehingga diperoleh persamaan regresi linier untuk penetapan kadar kuersetin dalam sampel (bahan uji).

Tabel Pembuatan Kurva Baku

Kadar kuersetin (ppm)	Peak area ($\lambda = 375$ nm)
506,667	1696,5
760,000	5195,8
1013,333	7238,4
1266,667	10422,9
1520,000	12809,7
1773,333	14849,6

Persamaan regresi linier dari kurva baku di atas adalah :

$$Y = 10,35X - 3099,60$$

$$r = 0,996805$$

Lampiran 5

Oneway

ANOVA OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,001	3	,000	5,593	,008
Within Groups	,001	16	,000		
Total	,002	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons Dependent Variable: OD LSD

(I) KLP	(J) KLP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,000	2,000	,01860	,004715	,001	,00860	,02860
	3,000	,01360	,004715	,011	,00360	,02360
	4,000	,01200	,004715	,022	,00200	,02200
2,000	1,000	-,01860	,004715	,001	-,02860	-,00860
	3,000	-,00500	,004715	,305	-,01500	,00500
	4,000	-,00660	,004715	,181	-,01660	,00340
3,000	1,000	-,01360	,004715	,011	-,02360	-,00360
	2,000	,00500	,004715	,305	-,00500	,01500
	4,000	-,00160	,004715	,739	-,01160	,00840
4,000	1,000	-,01200	,004715	,022	-,02200	-,00200
	2,000	,00660	,004715	,181	-,00340	,01660
	3,000	,00160	,004715	,739	-,00840	,01160

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