

SKRIPSI

ERNY SETYOWATI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 70% DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.) TERHADAP AKTIVITAS KOMPLEMEN PADA TIKUS



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2004**

Lembar Pengesahan

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 70% DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.) TERHADAP AKTIVITAS KOMPLEMEN PADA TIKUS

SKRIPSI

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

Oleh :

**ERNY SETYOWATI
NIM : 050012296**

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama

**Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP : 130 355 372**

Pembimbing Serta

**Dra. Rakhmawati, M.Si
NIP : 131 570 351**

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat, hidayah dan kasih sayang-Nya yang tak pernah putus sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi yang berjudul “PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL 70% DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.) TERHADAP AKTIVITAS KOMPLEMEN PADA TIKUS” dalam rangka untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Keberhasilan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu perkenankanlah penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Suprpto Ma’at, MS dan Idha Kusumawati, SSi, Msi selaku pimpinan proyek penelitian yang telah banyak memberikan bantuan dan dukungan baik moral maupun material sampai selesainya skripsi ini
2. QUE Project dan BPOM selaku penyandang dana penelitian
3. Prof. Dr. Noor Cholies Zaini selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan dosen pembimbing utama yang telah dengan tulus ikhlas membimbing, memberikan nasehat dan saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan
4. Dra. Rakhmawati, 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.
5. Dr. Suprpto Ma’at, MS dan Drs. Sukardiman, MS sebagai dosen penguji yang telah memberikan saran-saran demi kesempurnaan skripsi ini
6. Dr. Mulja Hadi Santosa selaku kepala Bagian Ilmu Bahan Alam dan Dr. Wahjo Dyatmiko selaku kepala pengelola laboratorium hewan beserta seluruh karyawannya atas segala fasilitas yang disediakan dan bantuan yang diberikan selama pengerjaan skripsi ini
7. Dra. Soemiati, MS selaku dosen wali yang telah membimbing penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga ini

8. Ayah, Bunda, dan adik-adikku (Aris dan Putri) yang telah memberikan perhatian, cinta dan kasih sayang yang tak pernah putus, doa dan dorongan semangat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan
9. Sahabat-sahabatku (Sriani, Endang, Miftah, Nurul, Arie, Emi, Etik, Rully, Ririn, Taza dan Asmoro), terima kasih atas perhatian, nasehat dan kebersamaannya selama ini
10. Seseorang di suatu tempat yang jauh, yang selalu memberi semangat, nasehat, perhatian dan doa untuk penulis
11. Teman-temanku “Tim Jambu Biji”, terima kasih atas semua bantuan dan kerja samanya selama pengerjaan skripsi ini
12. Teman-teman angkatan '00 FFUA, terima kasih atas kebersamaannya
13. 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

Jambu biji (*Psidium guajava* L) merupakan salah satu tanaman yang telah banyak digunakan oleh masyarakat secara tradisional untuk pengobatan berbagai macam penyakit, antara lain diare, sariawan, keputihan dan luka berdarah (Wijayakusuma, 1994). Buah jambu biji juga digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan penyakit demam berdarah, karena telah banyak pengalaman yang membuktikan bahwa pasien sembuh setelah makan buah jambu biji (Anonim, 2003^a). Karena buah jambu biji dapat digunakan untuk pengobatan demam berdarah, diharapkan daunnya juga memiliki khasiat yang sama. Selain itu, hasil studi klinis yang dilakukan oleh Harijono Achmad menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji dapat mengatasi demam berdarah dengan meningkatkan jumlah trombosit pada pasien secara efektif (Achmad, 2001). Namun, belum diketahui senyawa yang berkhasiat dan mekanisme lain dari penyembuhan demam berdarah tersebut.

Demam berdarah merupakan masalah kesehatan yang besar di Indonesia (Wuryadi, 1990). Pada pasien demam berdarah selalu ditemukan adanya peningkatan aktivitas komplemen (WHO, 1999). Aktivasi sistem komplemen ini dapat terjadi karena virus dengue yang masuk ke dalam tubuh penderita dianggap sebagai antigen yang akan membentuk kompleks dengan antibodi, yang disebut kompleks imun. Selanjutnya kompleks imun tersebut akan mengaktifasi sistem komplemen dan menghasilkan anafilatoksin C3a dan C5a yang merupakan mediator kuat peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Meningkatnya permeabilitas pembuluh darah akan menyebabkan kebocoran plasma yang bisa menyebabkan syok bahkan kematian. Aktivitas komplemen yang meningkat secara berlebihan ini sangat berbahaya bagi kondisi pasien.

Sampai saat ini belum ditemukan obat untuk penyakit demam berdarah dan belum diketahui mekanisme lain penyembuhan demam berdarah oleh ekstrak daun jambu biji tersebut. Karena aktivitas komplemen pada pasien demam berdarah selalu meningkat (WHO, 1999), maka ekstrak daun jambu biji yang telah digunakan untuk pengobatan demam berdarah diharapkan mampu menurunkan aktivitas komplemen yang selalu meningkat tersebut. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas ekstrak daun jambu biji terhadap sistem komplemen.

Pada penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap aktivitas komplemen pada tikus ini, digunakan kuersetin sebagai senyawa marker, karena diduga senyawa ini memiliki aktivitas anti komplemen. Penelitian yang telah dilakukan oleh Kanyanga Cimanga menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari daun *Morinda morindoides*, yang diketahui mengandung kuersetin, kuersitrin, dan rutin menunjukkan aktivitas anti komplemen secara in vitro (Cimanga, 1995).

Ekstrak etanol 70% daun jambu biji, yang diperoleh dari proses maserasi-perkolasi, digunakan sebagai bahan uji dalam penelitian ini. Ekstrak tersebut terlebih dahulu diuji kualitatif dengan menggunakan metode KLT-Densitometri

untuk mengetahui kandungan senyawa dalam ekstrak, terutama senyawa kuersetin yang digunakan sebagai marker, dan mengetahui profil kandungan senyawa dalam ekstrak. Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa di dalam ekstrak etanol 70% daun jambu biji tersebut terdapat senyawa kuersetin dan senyawa yang lain. Disamping itu juga dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui kadar kuersetin dalam ekstrak. Dari hasil uji kuantitatif dengan metode KLT-Densitometri diketahui bahwa kadar kuersetin dalam ekstrak adalah 2,46%.

Dosis yang dipakai pada penelitian ini dihitung berdasarkan dosis yang digunakan oleh Harijono Achmad pada studi klinis terhadap pasien demam berdarah, yaitu sebesar 5,31 mg kuersetin/50 kg BB manusia. Selanjutnya dosis ini dikonversikan ke tikus dan diperoleh dosis sebesar 0,133 mg kuersetin/200 g BB tikus. Pada penelitian ini digunakan tiga macam dosis yang berbeda, yaitu setengah, satu dan dua kali dosis di atas. Berdasarkan hasil uji kuantitatif kadar kuersetin dalam ekstrak, maka dapat dihitung dosis ekstrak yang digunakan, yaitu 2,724 mg/200 g BB tikus (dosis 1), 5,407 mg/200 g BB tikus (dosis 2) dan 10,813 mg/ 200 g BB tikus (dosis 3).

Metode yang sesuai untuk mengetahui interaksi senyawa-senyawa dengan komplemen adalah uji hemolitik total in vitro (Dey,1991). Pengujian hemolitik total komplemen dimaksudkan untuk mengukur efek total dari komponen C1-C9 yang berinteraksi secara beruntun dan berakhir dengan lisis sel target. Sebagai sel target digunakan sel darah merah domba yang telah disensitisasi, sedangkan serum tikus yang telah diberi perlakuan dengan ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan tiga macam dosis tersebut digunakan untuk mengukur kemampuan komplemen untuk melisis sel target. Aktivitas komplemen dalam serum dapat dilihat dari sel darah merah yang lisis. Hemolisis diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 541 nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum dari hemoglobin. Absorban dari hemoglobin ini menunjukkan jumlah sel darah merah yang lisis, yang berarti juga menunjukkan aktivitas komplemen dalam serum.

Adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap aktivitas komplemen pada tikus ini dapat dilihat dengan membandingkan harga OD (absorban hemoglobin) dari kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Dari hasil uji hemolitik komplemen diperoleh harga OD rata-rata kelompok kontrol sebesar 0,456, sedangkan kelompok uji memiliki harga OD rata-rata masing-masing sebesar 0,447 (dosis 1), 0,343 (dosis 2) dan 0,335 (dosis 3). Bila dilihat dari harga OD rata-rata tersebut tampak adanya perbedaan antar kelompok perlakuan, di mana dengan peningkatan dosis ekstrak, harga OD semakin menurun. Namun demikian perlu dilakukan uji statistik untuk membuktikan bahwa memang ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Uji statistik yang digunakan adalah anava satu arah pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji LSD untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda bermakna. Dari hasil uji LSD diketahui bahwa kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok kontrol adalah kelompok dosis 2 dan dosis 3 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun jambu biji yang dapat menurunkan aktivitas komplemen pada tikus adalah dosis 2 (5,407 mg/200 g BB tikus) dan dosis 3 (10,813 mg/ 200 g BB tikus).

Meskipun hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun jambu biji dapat menurunkan aktivitas komplemen pada tikus, tetapi belum diketahui bagaimana mekanisme penurunan aktivitas komplemen oleh ekstrak etanol 70% daun jambu biji tersebut. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme penurunan aktivitas komplemen oleh ekstrak tersebut.

ABSTRACT

The Influence of 70% Ethanol Extract of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves on The Rat Complement Activity

The 70% ethanol extract of guava (*Psidium guajava* L.) leaves was tested for its influence on the rat complement activity. This extract was tested to rat with three kinds of doses : 2.724 mg extract/200 g of rat, 5.407 mg extract/200 g of rat and 10.813 mg extract/200 g of rat. The dose of 70% ethanol extract of guava leaves was determined by the quercetin. This reason was based on the former research which stated that quercetin in ethyl acetate fraction of *Morinda morindoides* leaves has showed anticomplementary activity (Cimanga, 1995).

Rat serum were taken 7 days after oral administration of 70% ethanol extract of guava leaves and then analized by total hemolytic complement assay. This method employed sheep erythrocytes which had been sensitized by hemolisin (antibody to sheep erythrocytes) as a target cells and rat serum which had been given tested substance as a source of complement. Hemolysis was measured by using spectrophotometer at 541 nm as the absorbance of released hemoglobin and can be directly related to the number of erythrocytes lysed. The result indicated that extract with dose 5.407 mg/200 g of rat and 10.813 mg/200 g of rat significantly inhibit complement activity. Because of hasn't been known yet how the mechanism of 70% ethanol extract of guava leaves to inhibit complement activity, so the next study needs to be done to know the mechanism.

Keywords : The 70% ethanol extract of guava (*Psidium guajava* L.) leaves, total hemolytic complement assay, complement activity

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	vii
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Permasalahan	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman <i>Psidium guajava</i> L	5
2.1.1 Klasifikasi Tanaman	5
2.1.2 Nama Daerah	5
2.1.3 Penyebaran dan Tempat Tumbuh	6
2.1.4 Morfologi Tanaman	6
2.1.5 Morfologi Simplisia	6
2.1.6 Kandungan Tanaman	7
2.1.7 Kegunaan Tanaman	8
2.2 Tinjauan Tentang Ekstrak	8
2.3 Tinjauan Tentang Demam Berdarah Dengue.....	9
2.3.1 Epidemiologi	9
2.3.2 Penyebab dan Cara Penularan	9
2.3.3 Patogenesis	10
2.3.4 Manifestasi Klinis	10
2.3.5 Pengobatan	11

2.4	Tinjauan Tentang Sistem Imun	11
2.5	Tinjauan Tentang Sistem Komplemen	12
2.5.1	Aktivasi Komplemen	12
2.5.2	Efek Biologis Komplemen	20
2.5.3	Peranan Komplemen dalam Fagositosis	20
BAB III	KERANGKA KONSEPTUAL	23
BAB IV	METODOLOGI PENELITIAN	25
4.1	Bahan Penelitian	25
4.1.1	Bahan Uji	25
4.1.2	Hewan Coba	25
4.1.3	Bahan Kimia	25
4.2	Alat Penelitian	26
4.3	Prosedur Kerja.....	26
4.3.1	Pembuatan Bahan Uji.....	26
4.3.2	Uji Kualitatif Senyawa Dalam Ekstrak.....	26
4.3.3	Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Bahan Uji.....	27
4.3.4	Perhitungan Dosis	27
4.3.5	Pembuatan Sediaan Per Oral.....	28
4.3.6	Perlakuan pada Hewan Coba	28
4.3.7	Uji Hemolitik Komplemen.....	28
4.4	Analisis Data	30
BAB V	HASIL PENELITIAN.....	31
5.1	Pembuatan Bahan Uji	31
5.2	Uji Kualitatif Senyawa Dalam Ekstrak.....	31
5.3	Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Bahan Uji	34
5.4	Perhitungan Dosis	35
5.4	Uji Hemolitik Komplemen.....	35
BAB VI	PEMBAHASAN	39
BAB VII	KESIMPULAN DAN SARAN	44
7.1	Kesimpulan	44
7.2	Saran	44
DAFTAR PUSTAKA		45

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel V.1 Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan metode maserasi-perkolasi	31
Tabel V.2 Nilai Rf hasil KLT dengan fase diam silika gel F ₂₅₄ ; fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) dan penampak noda radiasi ultraviolet	32
Tabel V.3 Kadar kuersetin dalam ekstrak etanol 70% daun jambu biji yang diukur dengan metode KLT-Densitometri	34
Tabel V.4 Rekapitulasi data <i>Optical Density</i> (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen dari berbagai kelompok perlakuan.....	35
Tabel V.5 Persentase penurunan aktivitas komplemen dari berbagai kelompok perlakuan	37
Tabel V.6 Hasil uji anava satu arah ($\alpha = 0,05$) dari data <i>Optical Density</i> (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen	37
Tabel V.7 Hasil uji LSD dari data <i>Optical Density</i> (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen	38

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Skema aktivasi sistem komplemen	17
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual	24
Gambar 5.1 Hasil KLT sampel dan standar kuersetin dengan fase diam silika gel F ₂₅₄ fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) dan penampak noda radiasi ultraviolet	31
Gambar 5.2 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 254 nm dengan fase diam silika gel F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25)	32
Gambar 5.3 Profil kromatogram kandungan senyawa dalam sampel (ekstrak etanol 70% daun jambu biji) pada λ 254 nm dengan fase diam silika gel F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25)	33
Gambar 5.4 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 360 nm dengan fase diam silika gel F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25)	33
Gambar 5.5 Profil kromatogram kandungan senyawa dalam sampel (ekstrak etanol 70% daun jambu biji) pada λ 360 nm dengan fase diam silika gel F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25)	34
Gambar 5.6 Penurunan harga rata-rata <i>Optical Density</i> (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen dari berbagai kelompok perlakuan	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Sertifikat serbuk simplisia daun jambu biji 48
Lampiran 2	Hasil anava satu arah ($\alpha = 0,05$) dari harga <i>Optical Density</i> (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen 49
Lampiran 3	Hasil Uji LSD dari harga <i>Optical Density</i> (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen 50
Lampiran 4	Pembuatan kurva baku untuk penetapan kadar kuersetin dalam bahan uji 51
Lampiran 5	Tabel perbandingan luas permukaan tubuh beberapa hewan coba dan manusia untuk perhitungan dosis 52

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penggunaan bahan alam untuk pengobatan bukanlah hal baru. Sejak ada manusia di permukaan bumi, maka sejak itu pula mereka sudah mengobati penyakit yang dideritanya menggunakan bahan alam (Sutrisno, 1983). Sampai saat ini obat tradisional diharapkan berperan dalam usaha-usaha pencegahan dan pengobatan penyakit. Penggunaan terutama didasarkan pada dugaan-dugaan dan hasil pengalaman yang diteruskan secara turun temurun, belum didasarkan pada hasil penelitian (Donatus, 1985). Oleh karena itu, penelitian obat tradisional sangat penting dalam upaya mengembangkan pengobatan alternatif yang berkualitas baik dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

Salah satu tanaman obat tersebut adalah jambu biji (*Psidium guajava* L). Tanaman ini banyak digunakan oleh masyarakat secara tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit antara lain diare, sariawan, dan keputihan (Wijayakusuma, 1994). Buah jambu biji juga digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan penyakit demam berdarah, karena telah banyak pengalaman yang membuktikan bahwa penderita bisa sembuh setelah meminum jus buah jambu biji berkali-kali (Hargono, 2003). Selain itu, hasil studi klinis yang dilakukan oleh Harijono Achmad menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji dapat digunakan untuk pengobatan demam berdarah dengan meningkatkan jumlah trombosit pada pasien tersebut (Achmad, 2001). Namun, belum diketahui senyawa apa yang berkhasiat dan mekanisme lain penyembuhan penyakit demam berdarah tersebut.

Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) juga telah mengembangkan ekstrak daun jambu biji untuk mengatasi penyakit demam berdarah. Perkembangan ekstrak daun jambu biji sebagai alternatif untuk mengatasi demam berdarah telah mencapai tahap studi klinis dengan hasil yang menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji tersebut dapat meningkatkan jumlah trombosit pada pasien demam berdarah secara efektif (Anonim, 2003^b).

Penyakit demam berdarah di Indonesia merupakan masalah kesehatan yang besar. Sejak dilaporkannya yang pertama kali, yaitu di Jakarta dan Surabaya pada

tahun 1968, penyakit ini makin meluas dan jumlah kasus makin meningkat (Wuryadi, 1990). Sejak tahun 1968 angka kesakitan rata-rata demam berdarah dengue di Indonesia terus meningkat dari 0,05% (1968) sampai mencapai angka tertinggi pada tahun 1988 yaitu 27,09 per 100.000 penduduk. Pada tahun 1994 insiden meningkat lagi dan sampai tahun 1996 terjadi kecenderungan peningkatan insiden. Walaupun angka kematian secara drastis menurun dari 41,3% pada tahun 1968 menjadi dibawah 3% pada tahun 1991, namun angka kesakitan rata-rata demam berdarah dengue di Indonesia cenderung meningkat (Soedarmo, 2002).

Pada dasarnya pengobatan demam berdarah dengue masih bersifat suportif dan simptomatik, yaitu mengatasi kehilangan cairan plasma sebagai akibat peningkatan permeabilitas kapiler dan sebagai akibat perdarahan (Hadinegoro dkk, 2000) karena vaksin untuk mencegah demam berdarah dengue maupun obat terhadap virus penyebabnya belum tersedia (Suroso, 1990).

Suatu hal yang selalu ditemukan pada pasien demam berdarah dengue adalah aktivasi sistem komplemen (WHO, 1999). Aktivasi sistem komplemen terjadi melalui mekanisme sebagai berikut : virus dengue yang masuk kedalam tubuh manusia dianggap sebagai antigen yang akan bereaksi dengan antibodi membentuk kompleks imun. Selanjutnya kompleks imun tersebut akan mengaktivasi komplemen sehingga menghasilkan anafilatoksin C3a dan C5a yang merupakan mediator kuat peningkatan permeabilitas vaskular. Meningkatnya kadar anafilatoksin C3a dan C5a menyebabkan permeabilitas vaskular meningkat sehingga bisa terjadi kebocoran plasma. Apabila volume plasma berkurang sampai lebih 30% dan berlangsung selama 24-38 jam serta nilai hematokrit meningkat sampai lebih dari 20%, maka akan terjadi syok. Syok yang tidak ditanggulangi secara adekuat akan menimbulkan anoksia jaringan, metabolik asidosis dan kematian (Sumarmo, 1990).

Sistem komplemen merupakan bagian penting dari pertahanan tubuh yang normal, berfungsi : pertama, menyelubungi partikel-partikel, seperti kompleks imun, dengan komponen-komponen tertentu komplemen mempermudah ingesti partikel tersebut oleh sel-sel fagosit (fungsi opsonik komplemen). Kedua, menghasilkan banyak produk pecahan protein komplemen untuk reseptor-reseptor positif yang terdapat pada berbagai macam sel-sel inflamatoris (fungsi

inflamatoris komplemen). Ketiga, protein-protein berdaya lambat dari kaskade komplemen membentuk kompleks serangan membran makromolekuler yang menyebabkan kematian sel sasaran. Aktivitas ini dapat diarahkan untuk melawan virus, bakteri, jamur, parasit, sel-sel terinfeksi, dan sel-sel tumor (fungsi sitolitik komplemen) (Bellanti, 1993). Oleh karena itu, sistem komplemen memiliki peranan yang sangat penting dalam mekanisme pertahanan tubuh, tidak terkecuali pertahanan melawan infeksi virus dengue.

Hasil studi klinis yang telah dilakukan oleh Harijono Achmad, 2001, menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji dapat digunakan untuk pengobatan demam berdarah dengue, sehingga diharapkan ekstrak tersebut juga dapat menurunkan aktivitas komplemen yang selalu meningkat pada pasien demam berdarah dengue. Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun jambu biji terhadap aktivitas komplemen.

Pada penelitian ini digunakan daun jambu biji, karena diharapkan daun jambu biji juga memiliki kandungan senyawa kimia yang sama dengan buah yang telah terbukti dapat digunakan untuk pengobatan demam berdarah. Selain itu, daun jambu biji lebih mudah diperoleh daripada buahnya dan proses pengolahannya lebih sederhana (Sugiarso, 2002).

Daun jambu biji yang dipakai sebagai bahan uji diekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi-perkolasi. Pelarut etanol 70% digunakan untuk mengekstraksi daun jambu biji karena daun jambu biji memiliki kandungan senyawa kimia yang kompleks dengan kelarutan yang berbeda-beda, sehingga dengan pelarut etanol 70% diharapkan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam daun jambu biji dapat tertarik seluruhnya. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuji kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa di dalam ekstrak tersebut, terutama untuk mengetahui adanya kuersetin yang digunakan sebagai senyawa marker. Di samping itu juga dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui kadar kuersetin di dalam ekstrak, yang akan digunakan sebagai dasar untuk perhitungan dosis bahan uji. Uji kualitatif dan kuantitatif ini dilakukan dengan metode KLT-Densitometri.

Dosis yang dipakai untuk uji aktivitas komplemen pada penelitian ini dihitung berdasarkan senyawa kuersetin, yang digunakan sebagai marker, karena

diduga kuersetin memiliki aktivitas anti komplemen. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Kanyanga Cimanga menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari daun *Morinda morindoides*, yang antara lain mengandung kuersetin, kuersitrin, dan rutin menunjukkan aktivitas anti komplemen secara in vitro (Cimanga, 1995).

Uji aktivitas komplemen pada penelitian ini dilakukan dengan metode *total hemolytic complement assay*, karena metode yang sesuai untuk mengetahui interaksi senyawa-senyawa dengan komplemen adalah uji hemolitik total in vitro (Dey,1991). Pengujian ini dimaksudkan untuk mengukur efek total dari komponen C1-C9 yang berinteraksi secara beruntun dan berakhir dengan lisis sel target. Sebagai sel target digunakan sel darah merah domba yang telah disensitisasi, sedangkan serum tikus yang telah diberi perlakuan dengan ekstrak etanol 70% daun jambu biji digunakan untuk mengukur kemampuan komplemen untuk melisis sel target. Aktivitas komplemen dalam serum dapat dilihat dari sel target yang lisis, yang diukur dengan spektrofotometer pada λ 541 nm.

1.2 Rumusan Permasalahan

Apakah pemberian per oral ekstrak etanol 70% daun jambu biji dapat menurunkan aktivitas komplemen pada tikus ?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap aktivitas komplemen pada tikus.

1.4 Hipotesis

Ekstrak etanol 70% daun jambu biji dapat menurunkan aktivitas komplemen pada tikus.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan sumbangan di bidang kefarmasian, khususnya dalam pengembangan obat dari bahan alam.
2. Dapat menjadi landasan bioaktivitas ekstrak etanol dalam jambu biji sebagai anti demam berdarah.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Tanaman *Psidium guajava* L

2.1.1 Klasifikasi tanaman

Divisi : Spermatophyta
 Anak Divisi : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledoneae
 Anak Kelas : Dialypetalae
 Bangsa : Myrtales
 Suku : Myrtaceae
 Marga : *Psidium*
 Jenis : *Psidium guajava* L
 (Tjitrosoepomo, 1991)

2.1.2 Nama daerah

Nusa Tenggara : Sotong (Bali), Gauwa (Ende), Goihawas (Sika),
 Kejawas, Kojabas (Timor), Kujabas (Roti)
 Sumatera : Glima Breueh (Aceh), Glimeu Beru (Gayo),
 Galiman (Batak), Masiambu (Nias), Biawas,
 Jambu Biawas, Jambu Biji, Jambu Susu (Melayu)
 Kalimantan : Nyibu (Dayak Busang)
 Jawa : Jambu Klutuk (Sunda), Bayawas, Jambu Krutuk,
 Petokal (Jawa), Jambu Bender, Jambu Bigi
 (Madura)
 Sulawesi : Goyawas (Manado), Dambu (Gorontalo), Jambu
 Paratugala (Makasar), Jambu Paratukala (Bugis)
 Maluku : Kayawase, Koyawase (Seram Barat), Kojawasu,
 Koyafate, Kojawase (Seram Selatan), Lutuhatu,
 Jambu Rutuno (Haruku), Goyawa (Halmahera
 Selatan, Ternate)

(Depkes RI, 1977).

2.1.3 Penyebaran dan tempat tumbuh

Tanaman *Psidium guajava* L berasal dari Amerika Tropis. Di Amerika Tropis banyak ditanam sebagai pohon buah-buahan dan sering tumbuh liar dengan ketinggian 1-1200 m (Steenis, 1997). Di Jawa umumnya terdapat pada ketinggian di bawah 1200 m dan sering tumbuh liar pada tanah yang gembur maupun liat, banyak air, dan tempat terbuka (Depkes RI, 1977).

2.1.4. Morfologi tanaman

Tanaman *Psidium guajava* L termasuk tanaman perdu atau pohon kecil dengan banyak percabangan, tinggi 3 m sampai 10 m dan kadang-kadang tingginya mencapai 12 m. Batang keras, kulit batang halus permukaannya, berwarna coklat dan mudah mengelupas. Daunnya berhadapan, bertulang menyirip, berbentuk bulat telur agak menjorong atau agak bundar sampai meruncing. Panjang helai daun 6 cm sampai 14 cm, lebar 3 cm sampai 6 cm, panjang tangkai 3 mm sampai 7 mm. Daun yang muda berambut, sedangkan daun yang tua permukaan atasnya licin (Depkes RI, 1977). Tepi daun rata agak melekok ke atas, warnanya hijau, letak berhadapan (Wijayakusuma, 1994). Bunga terletak di ketiak, terdiri dari 1 sampai 3 bunga, panjang gagang perbungaan 2 cm sampai 4 cm. Tabung kelopak berbentuk lonceng atau corong, panjang kelopak 7 mm sampai 10 mm. Daun mahkota berbentuk bulat telur terbalik, panjang 1,5 cm sampai 2 cm, putih, segera rontok (Steenis, 1997). Buah bentuk bulat atau bulat telur, kalau masak berwarna kuning, panjang 5 cm sampai 8,5 cm, berdaging dan menyelimuti biji-biji (Depkes RI, 1977). Daging buah putih kekuningan atau merah muda (Steenis, 1997).

2.1.5 Morfologi simplisia

a. Makroskopik

Daun : tunggal, bertangkai pendek, panjang tangkai daun 0,5 cm sampai 1 cm, helai daun berbentuk bundar telur agak menjorong atau bulat memanjang, panjang 5 cm sampai 13 cm, lebar 3 cm sampai 6 cm, pinggir daun agak menggulung ke atas. Permukaan atas agak licin, warnanya hijau kelabu, kelenjar minyak tampak sebagai bintik-bintik berwarna gelap, dan bila daun direndam

tampak sebagai bintik-bintik yang tembus cahaya. Ibu tulang daun dan tulang cabang menonjol pada permukaan bawah, bertulang menyirip, warna putih kehijauan. Daun jambu biji memiliki bau yang aromatik.

b. Mikroskopis

Epidermis atas terdiri dari satu lapis sel, pipih, terentang tangensial, bentuk poligonal, dinding antiklinal lurus, tidak terdapat stomata. Pada epidermis bawah sel lebih kecil, pipih, terentang tangensial, bentuk poligonal, dinding antiklinal lurus. Stomata bentuk anomositik, banyak terdapat pada permukaan bawah. Rambut penutup terdapat pada kedua permukaan, lebih banyak pada permukaan bawah, bentuk kerucut ramping yang umumnya agak bengkok, terdiri dari satu sel, berdinding tebal, jernih, panjang rambut 150 μm sampai 300 μm , pangkal rambut kadang-kadang agak membengkok, lumen kadang-kadang mengandung zat berwarna kuning kecoklatan. Jaringan air terdapat pada epidermis atas, terdiri dari dua sampai tiga lapis sel yang besar, jernih dan tersusun rapat tanpa ruang antar sel. Idioblas terdapat pada beberapa tempat, berisi hablur kalsium oksalat berbentuk roset yang besar dan bentuk prisma. Kelenjar minyak: rongga minyak bentuk lisigen besar, terdapat lebih banyak di bagian bawah daripada di bagian atas. Jaringan palisade: terdiri dari lima sampai enam lapis sel, terletak di bawah jaringan air, dua lapis sel yang pertama lebih besar dan mengandung lebih banyak zat hijau daun, lapisan-lapisan berikutnya berongga lebih banyak. Serbuk: warna hijau keabu-abuan. Fragmen pengenal banyak terdapat rambut penutup terlepas, hablur kalsium oksalat, stomata anomositik, mesofil dengan kelenjar lisigen (Depkes RI, 1977).

2.1.6 Kandungan tanaman

Kandungan tanaman *Psidium guajava* L antara lain adalah tannin 9-12%, minyak lemak, asam malat (Depkes RI, 1977), minyak atsiri (eugenol), damar 3% dan banyak kalsium oksalat (Aliadi dkk, 1996), triterpenoid, asam amino (triptofan, lisin), kalsium, fosfor, besi, belerang, vitamin A, B, dan C (Wijayakusuma, 1994), betakaroten, klorofil, limonena, kuersetin, kuersitrin (Hargono, 2003) serta garam-garam mineral (Mardisiswojo dan Sudarso, 1985).

2.1.7 Kegunaan tanaman

Tanaman ini dapat digunakan sebagai obat diare, keputihan, sariawan, radang lambung, dan cucur darah tak henti-henti (Mardisiswojo dan Sudarso, 1985). Di samping itu juga pengobatan gangguan pencernaan pada bayi, peluruh haid, mempermudah persalinan, kencing manis, perut kembung, dan luka berdarah. Daun segar juga dipakai pada luka akibat kecelakaan, perdarahan akibat benda tajam, dan borok (ulkus) disekitar tulang (Wijayakusuma, 1994). Buah jambu biji juga telah banyak digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan demam berdarah (Anonim, 2003^a).

2.2 Tinjauan Tentang Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan, dan masa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995).

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya.

Secara umum metode yang digunakan ada dua macam, yaitu perkolasi dan maserasi. Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruang. Sedangkan perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruang. Proses terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan / penampungan) terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000). Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh perkolat biasanya dipekatkan dengan cara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan utama obat sesedikit mungkin terkena panas (Depkes RI, 2000).

2.3 Tinjauan Tentang Demam Berdarah Dengue

Demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus dengue dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*.

2.3.1 Epidemiologi

Pada tahun 1779, David Blyden pernah melaporkan terjadinya letusan demam dengue di Batavia. Wabah demam dengue terjadi pada tahun 1871-1873 di Zanzibar kemudian di pantai Arab dan terus menyebar ke Samudra India. Quintos dkk, pada tahun 1953 melaporkan kasus DBD di Filipina, disusul Thailand dan Vietnam. Pada dekade enam puluhan, penyakit ini mulai menyebar ke negara-negara Asia Tenggara termasuk Indonesia.

Di Indonesia, DBD pertama kali dicurigai di Surabaya pada tahun 1968, tetapi konfirmasi virologis baru diperoleh pada tahun 1978. Di Jakarta kasus pertama dilaporkan pada tahun 1969, kemudian disusul di Bandung dan Yogyakarta pada tahun 1972, Sumatera Barat dan Lampung (1972), Riau, Sulawesi Utara dan Bali pada 1973 dan Kalimantan serta Nusa Tenggara Barat pada 1974. Pada tahun 1994, DBD telah menyebar ke seluruh propinsi di Indonesia dan pada saat ini DBD sudah endemis di banyak kota besar (Soedarmo, 2002).

2.3.2 Penyebab dan Cara Penularan

Demam dengue dan demam berdarah dengue disebabkan virus dengue, termasuk grup B *Arthropod borne virus (Arboviruses)* dan sekarang dikenal sebagai genus *Flavivirus* famili *Flaviviridae* dan punya empat jenis serotip yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Serotip DEN-3 merupakan serotip yang dominan dan banyak berhubungan dengan kasus berat.

Terdapat tiga faktor yang memegang peran pada penularan infeksi dengue yaitu manusia, virus, dan vektor perantara. Nyamuk *Aedes aegypti* adalah vektor utama penyakit DBD di daerah tropik. Vektor yang lain adalah nyamuk *Aedes albopictus* dan *Aedes polynesiensis*, tapi kurang berperan dalam menularkan virus (Hadinegoro dkk, 2002; Sukana, 1993).

2.3.3 Patogenesis

Virus dengue masuk ke dalam tubuh melalui gigitan nyamuk dan infeksi pertama kali mungkin memberi gejala sebagai demam dengue. Reaksi tubuh merupakan reaksi yang biasa terlihat pada infeksi oleh virus. Reaksi yang amat berbeda akan tampak bila seseorang mendapat infeksi berulang dengan tipe virus dengue yang berlainan. Berdasarkan hal ini timbulah yang disebut *the secondary heterologous infection* atau *the sequential infection hypothesis*. Hipotesis ini menyatakan bahwa demam berdarah dengue dapat terjadi bila seseorang setelah terinfeksi virus dengue pertama kali, mendapat infeksi berulang virus dengue lainnya (Hendarwanto, 1999).

Ada dua perubahan patofisiologis utama terjadi pada DBD. Pertama adalah peningkatan permeabilitas vaskular yang meningkatkan kehilangan plasma dari kompartemen vaskular. Perubahan kedua adalah gangguan pada hemostasis yang mencakup perubahan vaskular trombositopenia dan koagulopati. Temuan konstan pada DBD adalah aktivasi sistem komplemen dengan depresi kadar C3 dan C5 (WHO, 1999).

Aktivasi komplemen dapat terjadi melalui mekanisme sebagai berikut: virus dengue yang masuk ke dalam tubuh manusia dianggap sebagai antigen yang akan bereaksi dengan antibodi kemudian akan mengaktifasi komplemen yang akan menghasilkan anafilatoksin C3a dan C5a yang merupakan mediator yang kuat untuk peningkatan permeabilitas vaskular. Adanya peningkatan permeabilitas vaskular ini bisa menyebabkan terjadinya kebocoran plasma dan terjadinya syok. (Sutaryo, 2002).

2.3.4 Manifestasi Klinis

Kasus khas DBD ditandai oleh empat manifestasi klinis : demam tinggi, fenomena perdarahan terutama perdarahan kulit, hepatomegali dan kegagalan peredaran darah (*circulatory failure*). Temuan laboratorium klinis khusus dari DBD adalah trombositopenia sedang sampai nyata dengan hemokonsentrasi secara bersamaan. Penyakit patofisiologis utama yang menentukan keparahan penyakit pada DBD adalah rembesan plasma, efusi serosa atau hipoproteinemia (WHO, 1999).

Tahap kritis dari perjalanan penyakit dicapai pada akhir fase demam. Pada kasus yang berat, bila kehilangan plasma sangat banyak (lebih dari 30%) dan berlangsung selama 24-48 jam serta meningkatnya nilai hematokrit sampai lebih dari 20% akan terjadi syok. Apabila hal ini tidak ditanggulangi secara adekuat akan dapat menimbulkan anoksia jaringan, metabolik asidosis dan kematian (Sumarmo, 1990).

2.3.5 Pengobatan

Pengobatan DBD bersifat suportif dan simptomatik karena vaksin untuk mencegah DBD maupun obat terhadap virus penyebabnya belum tersedia (Suroso, 1990). Pengobatan terutama ditujukan untuk mengatasi perdarahan, untuk mengatasi syok/presyok dengan mengusahakan agar penderita banyak minum. Bila perlu dilakukan pemberian cairan melalui infus dan demam diusahakan diturunkan dengan pemberian antipiretik (Sudrajat, 2000).

2.4 Tinjauan Tentang Sistem Imun

Lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, misalnya bakteri, virus, fungus, protozoa, dan parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi yang terjadi pada orang normal umumnya singkat dan jarang meninggalkan kerusakan permanen. Hal ini disebabkan tubuh manusia memiliki suatu sistem yang disebut sistem imun, yang melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen tersebut (Kresno, 1996). Jadi, sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan tubuh untuk mempertahankan keutuhan tubuh dan sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup.

Sistem imun terdiri dari sistem imun nonspesifik dan sistem imun spesifik. Respon imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*) dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar zat tersebut. Sedangkan respon imun spesifik merupakan respon didapat (*acquired*) yang timbul terhadap antigen tertentu, terhadap mana tubuh pernah terpapar sebelumnya (Kresno, 1996).

Yang termasuk dalam sistem imun nonspesifik adalah respon imun seluler yang berupa aktivitas fagositosis oleh sel-sel inflamasi dan respon imun humoral yang berasal dari komplemen yang berperan meningkatkan fagositosis melalui opsonisasi dan pelepasan faktor kemotaktik.

2.5 Tinjauan Tentang Sistem Komplemen

Komplemen merupakan salah satu sistem imun non spesifik yang terdiri dari protein-protein plasma, yang terdapat di dalam darah dalam bentuk inaktif.

Di dalam sistem komplemen terdapat hampir 30 protein plasma dan protein membran yang berperan. Komponen komplemen sendiri terdiri dari protein yang dinamakan C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, dan C9 yang secara normal di dalam plasma dalam bentuk tidak aktif, yang dihasilkan oleh sel-sel makrofag dan limfosit (Hokama, 1982).

Selain komponen komplemen, di dalam sistem komplemen juga terdapat protein-protein regulator yang terdapat bebas maupun terikat pada sel di dalam plasma. Secara keseluruhan, sistem komplemen terdiri dari dua jalur aktivasi, satu jalur terminal, protein-protein regulator, dan reseptor komplemen.

Sistem komplemen merupakan bagian penting dari pertahanan tubuh yang normal, berfungsi : pertama, menyelubungi partikel-partikel, seperti kompleks imun, dengan komponen-komponen tertentu komplemen mempermudah ingesti partikel tersebut oleh sel-sel fagosit (fungsi opsonik komplemen). Kedua, menghasilkan banyak produk pecahan protein komplemen untuk reseptor-reseptor positif yang terdapat pada berbagai macam sel-sel inflamatoris (fungsi inflamatoris komplemen). Ketiga, protein-protein berdaya lambat dari kaskade komplemen membentuk kompleks serangan membran makromolekuler yang menyebabkan kematian sel sasaran. Aktivitas ini dapat diarahkan untuk melawan virus, bakteri, jamur, parasit, sel-sel terinfeksi, dan sel-sel tumor (fungsi sitolitik komplemen) (Bellanti, 1993).

2.5.1 Aktivasi komplemen

Aktivasi komplemen dapat terjadi melalui dua jalur tersendiri, yaitu jalur klasik dan jalur alternatif, kedua jalur ini menuju ke jalur terminal bersama yang

dikenal dengan jalur serangan membran. Baik jalur klasik maupun jalur alternatif dapat diorganisasi menjadi berbagai unit permulaan operasional (*initiation*), penguatan (*amplification*), dan serangan membran (*the membrane attack complex*) (Bellanti, 1993). Aktivasi komplemen ini terjadi secara beruntun, yang berarti bahwa produk yang timbul pada satu reaksi akan merupakan enzim untuk reaksi berikutnya (Baratawidjaja, 1991).

Istilah aktivasi digunakan apabila masing-masing komponen komplemen mengalami proses kimia dan fisika untuk menjadi unit integrasi yang fungsional serta memiliki aktivitas enzimatik atau aktivitas biologis. Proses aktivasi komplemen merupakan suatu reaksi enzimatik (*a limited protolytic cleavage*), di mana enzim-enzim yang bertanggung jawab pada reaksi tersebut biasanya molekul komplemen lainnya yang telah teraktivasi oleh reaksi proteolitik juga. C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, dan faktor B semuanya teraktivasi dengan adanya reaksi proteolitik.

Gambaran dari aktivasi komplemen adalah pecahnya protein komplemen menjadi bagian yang besar (diberi tanda huruf b) dan bagian yang kecil (diberi tanda huruf a), selanjutnya akan terbentuk kompleks multimolekuler dari protein komplemen yang pecah tersebut, yang biasanya mengikuti suatu *a regulated self assembly mechanism*. Fungsi utama dari jalur aktivasi adalah menghasilkan C3 konvertase (Baratawidjaja, 1991).

(1) Aktivasi Jalur Klasik

Aktivasi jalur klasik terdiri dari C1, (C1q, C1r, C1s), C4, C2, C3, dan diaktivasi secara imunologis oleh adanya kompleks antigen-antibodi kelas IgM dan IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃) dimana C1q mengikat satu mol IgM atau dua mol IgG atau secara nonimunologis, yaitu sejumlah agen seperti : DNA, senyawa poli anion, kompleks *C Reaktif Protein* (CRP) dengan fosfolipid, lipid A dari lipopolisakarida bakteri gram negatif. IgA, Ig4 dan IgE tidak dapat mengaktifkan C1q (Hokama , 1982 ; Baratawidjaja,1991).

Aktivasi C1

Komplemen pertama yang diaktifkan adalah kompleks C1 yang terdiri dari C1q, C1r, dan C1s. C1q sendiri terdiri dari 6 subunit yang identik. Aktivasi C1q memerlukan ikatan subunit C1q dengan sedikitnya dua fraksi Fc dari molekul-molekul antibodi terikat antigen (IgG₁, IgG₂ atau IgG₃). C1q yang telah diaktifkan selanjutnya mengaktifkan C1r, dimana dasar kimiawi dari aktivitas ini adalah pemecahan ikatan peptida dengan mekanisme autokatalisis, dan selanjutnya mengaktifkan C1s. C1s ini mempunyai sifat esterolitik dan proteolitik. Kemudian C1s akan mengaktifkan C4. Dengan demikian, pengikatan C1q pada imunoglobulin dalam kompleks dengan antigen memainkan peran peristiwa pengenalan dari jalur klasik, mengakibatkan terjadinya aktivasi C1r dan C1s yang selanjutnya menuju kepada penguatan peristiwa pengenalan (Baratawidjaja, 1999; Stites, 1994).

Aktivasi C4 dan C2

Enzim C1s mempunyai dua landasan fisiologis, C4 dan C2. C1s dapat memecah C4 menghasilkan C4a yang merupakan salah satu anafilatoksin (molekul yang dapat meningkatkan permeabilitas vaskular dan kontraksi otot polos) yang akan dilepaskan, dan C4b yang akan membentuk ikatan dengan permukaan sel sasaran untuk melanjutkan kaskade (Bellanti, 1993).

Selain itu C1s dapat memecah C2 menghasilkan C2a dan C2b, dimana C2b dilepaskan sedangkan C2a tetap terikat pada C4b. Kompleks bimolekuler C4b2a adalah protease yang memecah C3 yang disebut sebagai konvertase C3 (Baratawidjaja, 1991 ; Stites, 1994).

Aktivasi C3

Dengan terbentuknya kompleks C4b2a (konvertase C3) maka C3 dipecah menghasilkan dua peptida aktif yang penting secara biologis, yaitu C3a (anafilatoksin lain) dan C3b, dimana C3a dilepaskan sedangkan C3b melekat pada permukaan sel sasaran membentuk kompleks C4b2a dan C3b. Kompleks C4b2a3b (konvertase C5) dapat memecah C5 menghasilkan C5a dan C5b (Baratawidjaja, 1991; Stites, 1994).

(2) Aktivasi Jalur Alternatif

Jalur alternatif dapat berfungsi tanpa adanya antibodi dan dapat terjadi secara spontan. Jalur alternatif dapat diaktifkan oleh polisakarida, berbagai mikroorganisme (virus influenza dan *Schistosoma*), dinding sel ragi (zimosan), agregat Ig A dan eritrosit kelinci. Jalur ini juga diaktifkan bila molekul C3b diikat pada sel sasaran. Molekul C3b bergabung dengan faktor B protein plasma, membentuk kompleks C3bB. Kompleks ini selanjutnya diaktifkan oleh faktor D protein plasma dengan pemecahan dua fragmen, Ba dan Bb. Fragmen Bb, yang mengandung sisi enzimatis, tetap terikat pada C3b sebagai C3bBb (yang merupakan konvertase C3). Kompleks ini distabilkan oleh ikatan protein plasma lain, yaitu Properdin.

Konvertase C3 (C3bBb) memecah C3 menjadi C3a dan C3b, sehingga menghasilkan lebih banyak molekul C3b. Molekul C3b ini dapat bergabung dengan molekul- molekul lain faktor B untuk menghasilkan lebih banyak molekul C3bBb, yang pada gilirannya dapat memecah lebih banyak molekul C3. Karena itu tanda-tanda pokok jalur alternatif adalah putaran umpan balik positif yang memperkuat peristiwa pengenalan awal.

Apabila C3b ini terikat pada permukaan host (nonaktivator), maka aktivasi selanjutnya akan dicegah oleh adanya mekanisme regulasi. Ada dua protein pengatur yang penting dalam plasma, yaitu faktor H dan faktor I. Faktor H berlomba dengan faktor B untuk mengikat C3b dan juga melepaskan C3bBb menjadi C3b dan Bb. Faktor I memecah C3b yang terikat pada faktor H atau pada protein yang serupa yang terdapat pada permukaan sel hospes menjadi iC3b yang tidak dapat lagi membentuk C3 konvertase. Kerja dari kedua protein pengatur ini mencegah pemakaian faktor B dan C3 dalam plasma dan menginaktifkan C3bBb pada permukaan sel hospes. Sebaliknya, apabila C3b terikat pada permukaan sel asing (aktivator), misalnya bakteri, maka akan terbentuk C3 konvertase pada permukaan sel karena bakteri tidak mempunyai mekanisme regulasi, sehingga memungkinkan perputaran umpan balik positif berjalan terus pada permukaan sel sasaran, menyebabkan aktivasi jalur dan selanjutnya kematian sel (Bellanti, 1993).

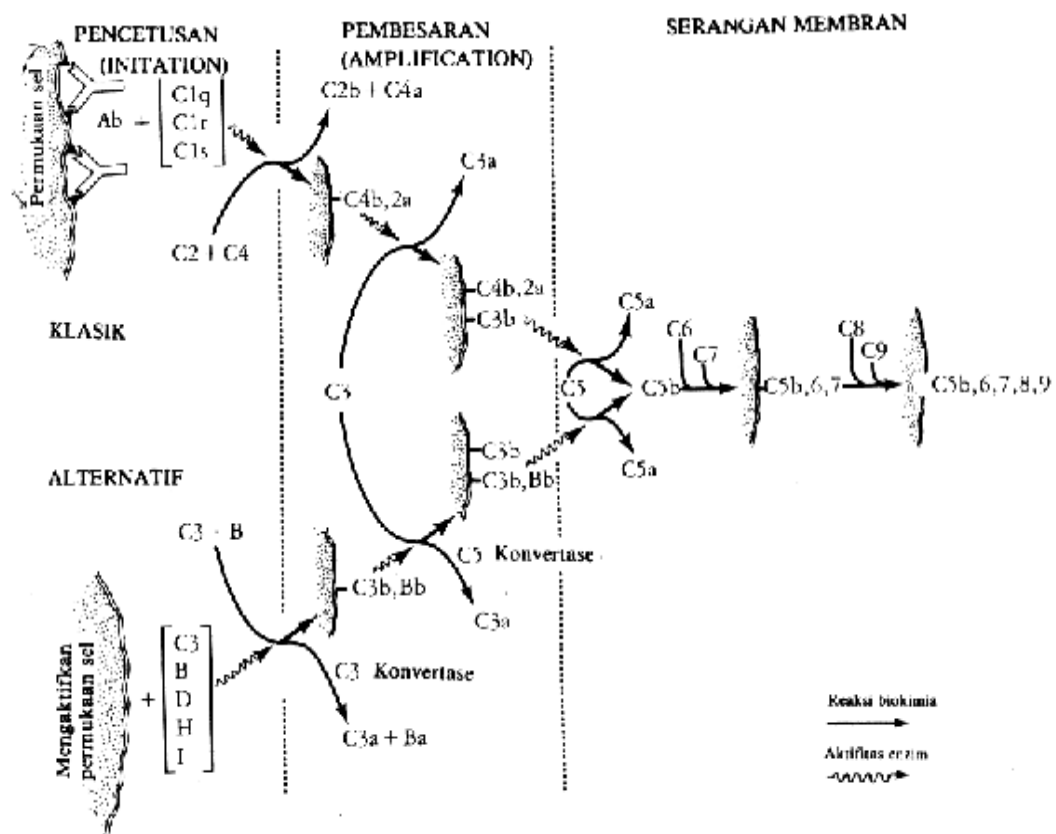
(3) Jalur terminal

Fungsi dari jalur terminal adalah membentuk kompleks serangan membran (MAC = *Membran Attack Complex*), yang merusak permukaan membran sel mikroorganisme tertentu.

Jalur ini dimulai oleh C5b yang merupakan produk dari kerja C5 konvertase yang memecah C5 menjadi C5a dan C5b. Pada jalur klasik, C5 konvertase adalah bentuk trimolekuler C4b2a3b; sedangkan pada jalur alternatif adalah trimolekul C3bBbC3b.

C5b yang baru timbul dapat mengikat C6, menghasilkan pembentukan kompleks C5b,6 yang stabil. selanjutnya C5b,6 bereaksi dengan C7 membentuk kompleks C5b,6,7 yang menunjukkan satu sisi pengikat yang metastabil melalui mana kompleks dapat mengikatkan dirinya pada membran sasaran. Meskipun sifat alami biokimiawi yang tepat dari sisi pengikat metastabil ini belum diketahui, diduga bahwa pengikatan terjadi melalui interaksi-interaksi hidrofobik dengan lipid-lipid membran. Selanjutnya pengikatan C8 ke kompleks C5b,6,7 terjadi pada membran sel, yang menyebabkan perpindahan C9 dari plasma ke membran sel sasaran dengan merangsang terjadinya polimerasi C9. Polimerasi C9 pada sel membran terjadi secara khas dengan pola melingkar menyisipkan silinder-silinder poli C9 yang terdiri dari 12 sampai 16 molekul-molekul C9. Silinder-silinder inilah yang bertanggung jawab pada lesi komplemen. Poli C9 dengan kompleks C5b,6,7,8 yang melekat biasanya disebut kompleks serangan membran. Semakin besar.

Telah dibuktikan bahwa daya membranolitik dari MAC seluruhnya disebabkan oleh interaksi-interaksi fisik. MAC adalah bangunan cekung dengan diameter bagian dalamnya 100 Å ; oleh karena itu, sisipannya ke dalam membran mengakibatkan saluran-saluran transmembran yang cukup besar, yang memungkinkan molekul-molekul protein melewatinya. Lagi pula kemampuan mengikat lipid yang kuat dari MAC menyebabkan disorganisasi pada dua lapis fosfolipid, dan mengakibatkan kerusakan fungsi membran (Bellanti, 1993).



Gambar 2.1 Skema aktivasi sistem komplemen (Bellanti, 1993)

Protein-protein regulator

Pada tiap tahap pelepasan mediator terdapat mekanisme tubuh untuk menetralsirnya, yang disebut regulator, sehingga tidak akan terjadi reaksi yang berlangsung terus menerus yang dapat mengakibatkan kerusakan jaringan. Sistem enzim yang kompleks ini diatur oleh beberapa penyekat protein yang dapat mencegah aktivasi prematur dan aktivitas yang memanjang dari setiap produk (Baratawidjaja, 1991).

Protein-protein regulator dikelompokkan dalam *plasma regulatory protein* dan *membrane bound regulatory proteins*. Yang termasuk regulator di dalam plasma adalah Properdin (P), C1 Inhibitor, Faktor I, *C4 binding protein* (C4bp), faktor H dan Vitronectin atau protein S, sedangkan yang termasuk regulator yang terikat membran adalah *Decay Accelerating Factor* (DAF) atau CD55, *Membrane*

Cofactor Protein (MCP) atau CD46, *Homologous Restriction Factor* (HRP) atau *C8-binding protein* (C8bp), HRF 20 atau *Membrane Attack Complex Inhibitor Factor* (MACIF) atau *Membrane Inhibitor of Reactive Lysis* atau CD59.

Protein regulator menurut fungsinya dapat diklasifikasikan dalam tiga kategori : (1) inhibitor yang menghambat secara spontan aktivasi didalam cairan, (2) regulator yang memperkecil kerja komplemen pada sel target dan (3) inhibitor yang melindungi sel host dari efek destruktif komplemen.

Faktor H, CR1, dan MCP semuanya memiliki aktivitas kofaktor terhadap faktor I (faktor I memecah C3b menjadi iC3b), namun masing-masing dalam kategori yang berbeda. Misalnya faktor H termasuk kategori 1, karena substratnya adalah C3b fase cairan; sedangkan substrat CR1 adalah C3b yang terikat pada sel target dan menginaktifkan C3/C5 konvertase (kategori 2). MCP bekerja pada C3 yang terikat pada sel host (kategori 3). Meskipun demikian, satu macam protein regulator dapat termasuk di dalam lebih dari satu kategori, misalnya faktor H dan CR1 juga berperan didalam proteksi sel host (Kinoshita, 1991).

Reseptor Komplemen

Fungsi utama dari reseptor komplemen adalah mengenali ligands, menghantarkan sinyal ke dalam sel dan kemudian menginduksi respon seluler, seperti fagositosis. Reseptor-reseptor sel pada *resting cells* cenderung bergerak secara planar di dalam membran dan tidak berhubungan dengan sitoskeleton, dimana hal ini dapat dideteksi dari kelarutannya di dalam detergen nonionik. Pada sel yang aktif dan selama proses fagositosis, reseptor menjadi terikat pada sitoskeleton (menjadi tidak larut dalam detergen nonionik) dan hal ini merupakan perantara dalam terjadinya proses penelanan (Kinoshita, 1991).

Sel-sel tertentu yang berperan didalam sistem pertahanan tubuh host dapat memiliki reseptor komplemen lebih dari satu, misalnya neutrofil dan makrofag, menunjukkan adanya CR1, CR3 dan reseptor C5a. C5a menginduksi terjadinya marginasi dan kemotaksis dari neutrofil, mengatur ekspresi CR1 dan CR3 pada permukaan sel, menimbulkan pengerahan sel fagosit menuju fokus inflamasi dan membuat fagosit aktif dalam proses fagositosis.

a) CR1

CR1 dapat ditemukan dalam sel darah primata, neutrofil, fagosit mononuklear, sel mast, sel B, beberapa sel T, dan podosit glomerulus. CR1 merupakan suatu glikoprotein, memiliki masa molekuler bervariasi antara 190-260 kDa. CR1 pada sel darah merah disebutkan memiliki peranan yang sangat penting di dalam katabolisme normal dari imun kompleks. Reseptor ini akan mengikat imun kompleks yang diliputi oleh komplemen di dalam sirkulasi dan menghilangkannya dari sirkulasi pada saat melewati sinusoid liver, sehingga mencegah deposisi imun kompleks pada jaringan. Pada penderita inflamasi oleh karena reaksi otoimun, khususnya oleh karena terjadi aktivasi komplemen, terlihat adanya jumlah CR1 yang menurun. CR1 berfungsi mengenali fragmen C3 dan C4 dan strukturnya merupakan suatu glikoprotein yang memiliki masa molekuler yang bervariasi dari 190-260 kDa.

b) CR3

Struktur CR3 merupakan protein yang disebut “beta-integrin”, yang terdiri dari rantai alfa (bervariasi) dan rantai beta dengan masa 95 kDa. Rantai alfa berfungsi mengenali iC3b, sedangkan rantai beta bertanggungjawab pada lokalisasi kompleks pada membran.

Beta-integrin penting untuk fenomena adhesi antar sel dengan sel dan sel dengan suatu permukaan, juga bertindak sebagai reseptor untuk struktur polisakarida dan fosfolipid, termasuk lipopolisakarida bakteri.

Pentingnya protein ini dalam proses fagositosis, dapat terlihat pada anak-anak yang sel-selnya memiliki penurunan ekspresi beta-integrin dimana anak-anak tersebut secara karakteristik mengalami hambatan pembelahan *umbilical cord* dan seringnya infeksi yang mengarah pada lesi dan indolen nekrotik atau lesi dari jaringan lunak. Pada anak tersebut juga terlihat gangguan emigrasi sel fagosit menuju fokus inflamasi (in vivo) dan penekanan aktivitas fagosit (in vitro).

CR3 pada monosit dan neutrofil sebagian berada pada membran (mobile) dan sisanya terikat dengan sitoskeleton. Pool yang bergerak akan memperantarai pengikatan yang bergantung iC3b, sedang yang berhubungan dengan sitoskeleton berperan mengembangkan fagositosis yang dipicu oleh reseptor Fc, IgG, dan CR1.

c) CR4

CR4 juga anggota dari protein beta-integrin, dengan masa rantai beta 150 kDa. CR4 juga mengenali iC3b, tetapi ekspresinya lebih banyak pada sel-sel monosit jaringan (Abbas,1991).

2.5.2 Efek Biologis Komplemen

Reaksi-reaksi biologis yang dipengaruhi komplemen ataupun produk dari aktivitas komplemen adalah lisis sel target, fagositosis, opsonisasi, perlekatan kompleks imun, kemotaksis dan perubahan permeabilitas.

Reaksi-reaksi biologis komplemen :

- C2b dan C4a : meningkatkan permeabilitas kapiler (mirip kinin)
- C3a dan C3b : meningkatkan fagositosis dari PMN dengan pelepasan materi lisosom dan perlekatan imun kompleks.
- C3a, C5a, dan C5b,6,7 : meningkatkan kemotaksis C3a, menunjukkan aktivitas mirip kinin
- C3e : mobilisasi leukosit dari sumsum tulang
- C3a, C4a, dan C5a : kontraksi otot polos
- C3a dan C5a : anafilatoksin, C5a menyebabkan pelepasan lisosom
- Bb : menghambat migrasi dan induksi penyebaran makrofag dan monosit
- C1-7 : memudahkan lymphocytotoxicity
- C1-9 : mengaktifasi enzim lisosom jaringan sitotoksik terhadap sel target yang tersensititasi
- C2 dan C4 : netralisasi virus (Bellanti, 1993)

2.5.3 Peranan Komplemen dalam Fagositosis

Lebih dari setengah abad sejak komplemen ditemukan, disebutkan dalam sistem komplemen adalah penting didalam kontrol terhadap infeksi oleh karena kemampuannya melisiskan beberapa organisme dan sel. Selanjutnya diketahui pula bahwa komplemen dapat meningkatkan sistem adherensi dari mikroorganisme dari sel fagosit dan berperanan sangat penting didalam respon inflamasi. Dengan diketahuinya kedua fungsi tersebut, maka dapat dibuktikan

bahwa fungsi komplemen lebih penting di dalam pertahanan tubuh daripada proses lisis yang diperantarai oleh komplemen.

Pentingnya komplemen pada proses fagositosis, dimana penghilangan mikroorganisme dari aliran darah dan didalam pertahanan tubuh host, telah banyak dipelajari dengan menggunakan hewan secara *in vivo* maupun pada individu yang kehilangan C3 ataupun salah satu protein komplemen yang bertanggung jawab pada tahap pemecahan C3. Ternyata pada individu-individu tersebut sering terserang bakteri patogen, suatu kontrol yang lebih memerlukan fagositosis daripada lisis. Pada penelitian dengan menggunakan hewan coba dengan *Haemophilus influenzae*, dimana mikroba ini peka terhadap lisis oleh komplemen, dapat ditunjukkan bahawa mekanisme pertahanan host untuk melawan sepsis adalah lebih tergantung pada opsonisasi dan penghilangan secara reticuloendothelial daripada kapasitas *lytic* dari plasma. Meskipun PMN merupakan sel fagosit yang didalam aliran darah dalam jumlah besar, tetapi PMN tidak efektif dalam hal penelanan dan penghancuran mikroorganisme didalam sirkulasi. Aktivitasi fagositosis PMN dan monosit darah meningkat bila melekat pada suatu permukaan dan paling efektif apabila meninggalkan aliran darah serta masuk ke dalam jaringan seperti pada fase terakhir dari proses inflamasi.

Telah lama diketahui bahwa serum segar meningkatkan suatu partikel pada sel fagosit. Kemudian, dapat diketahui bahwa mikroorganisme tersebut diopsonisasi oleh peptida derivat protein komplemen yang dikenal oleh reseptor spesifik pada sel fagosit melalui ligan karbohidrat dari mikroorganisme. Interaksi dengan reseptor ini menyebabkan mikroorganisme tidak dapat bergerak dan kemudian menimbulkan proses fagositosis.

Proses fagositosis dapat dibagi dalam beberapa fase. Sebagai fase awal adalah fiksasi dari target pada permukaan sel fagosit. Fiksasi ini sering disempurnakan oleh adanya interaksi antara residu komplemen dengan reseptor spesifik pada permukaan sel fagosit. Reseptor-reseptor untuk C1q dan produk pemecahan C3 (C3b, iC3b, dan C3dg) terdapat pada berbagai macam sel, diantaranya sel fagosit. Reseptor komplemen memiliki aktivitas relatif rendah, sehingga untuk perlekatan yang kuat dari target pada fagosit diperlukan interaksi ligan-reseptor yang cukup banyak. Kemudian agregasi reseptor-reseptor

komplemen pada fase awal fagositosis akan memicu mekanisme *oxidative burst* serta degranulasi di dalam sel.

Pada suatu penelitian, interaksi sel darah merah yang diopsonisasi komplemen dengan reseptor-reseptor tersebut tidak menyebabkan timbulnya proses fagositosis tanpa ada sinyal aktivitas yang kedua. Sinyal kedua ini berupa molekul IgG yang meliputi permukaan target dan menggunakan reseptor Fc dari fagosit. Dalam hal ini interaksi reseptor dengan komplemen dapat meningkatkan *IgG dependent phagocytosis* atau memungkinkan fagositosis yang dipicu oleh kadar IgG rendah. Tetapi aktivitas sel fagosit yang diinduksi oleh senyawa ester phorbol dapat memicu penelanan dari target yang diopsonisasi dari fragmen C3 saja. Perlekatan fagosit mononuklear pada matriks protein ekstraseluler seperti laminin, fibronectin, dan kolagen tipe1 juga merangsang penelanan target yang diopsonisasi oleh komplemen, demikian juga apabila fagosit kontak dengan produk solubel dari limfosit T (limfokin). Namun demikian, tidak seperti halnya sel darah merah bakteri yang diliputi oleh C3b tanpa adanya IgG yang melekat pada sel fagosit dapat ditelan oleh sel fagosit. Hal ini diperkirakan oleh adanya bakterial karbohidrat yang dapat bertindak sebagai *the second signal* (Frank dan Fries, 1991).

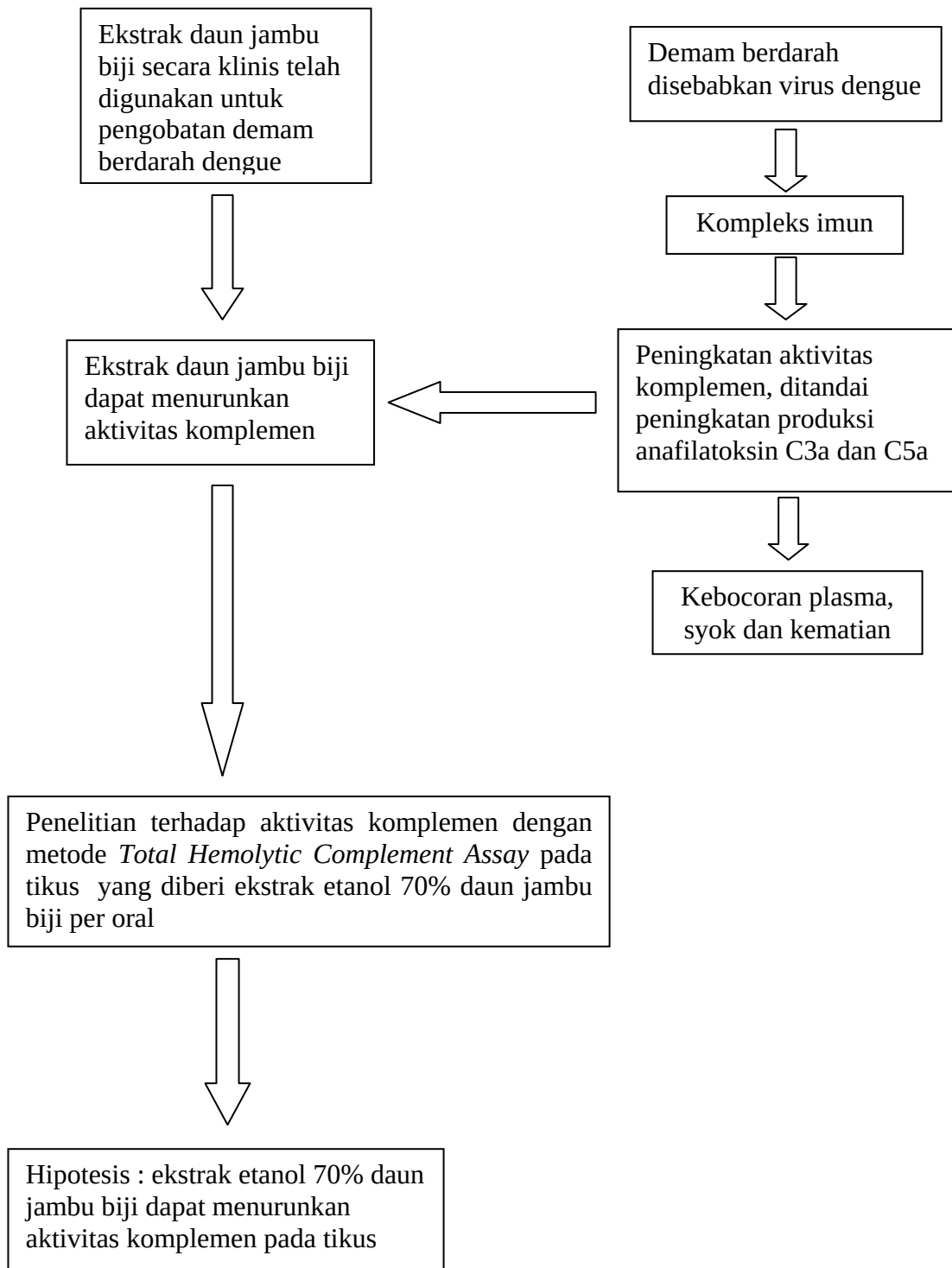
BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Demam berdarah dengue disebabkan oleh virus dengue. Apabila virus dengue masuk ke dalam tubuh manusia, maka virus tersebut akan membentuk suatu kompleks dengan antibodi, yang disebut sebagai kompleks antigen antibodi atau kompleks imun. Kompleks imun akan mengaktivasi sistem komplemen, yang berakibat dilepaskannya anafilatoksin C3a dan C5a dalam jumlah besar. Anafilatoksin merupakan mediator kuat peningkatan permeabilitas vaskular, sehingga meningkatnya kadar anafilatoksin ini menyebabkan meningkatnya permeabilitas vaskular. Akibatnya terjadi kebocoran plasma yang dapat berkembang cepat menjadi syok bahkan kematian (WHO, 1999).

Sampai saat ini pengobatan demam berdarah dengue umumnya masih bersifat suportif dan simptomatik. Dari studi klinis telah dibuktikan bahwa ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat digunakan untuk pengobatan demam berdarah dengue (Achmad, 2001). Karena aktivitas komplemen pada pasien demam berdarah selalu meningkat (WHO, 1999), diharapkan ekstrak daun jambu biji juga dapat menurunkan aktivitas komplemen yang selalu meningkat tersebut. Oleh karena itu dilakukan penelitian terhadap aktivitas komplemen pada tikus yang diberi ekstrak etanol 70% daun jambu biji secara per oral, untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol 70% daun jambu biji tersebut terhadap aktivitas komplemen. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *total hemolytic complement assay* dengan prinsip pengujian mengukur kemampuan hemolitik dari komplemen terhadap indikator hemolitik yang terdiri dari sel darah merah domba dan hemolisin.

Penelitian ini diharapkan dapat membuktikan hipotesis bahwa pemberian ekstrak etanol 70% daun jambu biji dapat menurunkan aktivitas komplemen, sehingga kemungkinan ekstrak daun jambu biji dapat dipakai sebagai alternatif untuk pengobatan demam berdarah meskipun hal ini perlu penelitian lebih lanjut.



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol 70% dari daun jambu biji (*Psidium guajava* L). Serbuk simplisia daun jambu biji diperoleh dari industri obat tradisional “X”.

4.1.2 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Tikus tersebut berjenis kelamin jantan, berat badan 200-300 gram, sehat dan tidak ada kelainan pada tubuhnya. Tikus ini dipelihara selama dua minggu untuk beradaptasi dengan lingkungan, dengan perlakuan yang sama dalam hal makanan, minuman, dan tempat.

4.1.3 Bahan kimia

- Natrium Barbitol (Sigma)
- Etanol 70%
- Barbitol (Sigma)
- Saline / larutan NaCl 0,5%
- CMC Na (E Merck)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (E Merck)
- NaCl (E Merck)
- CaCl_2 (E Merck)
- Hemolisin (Sigma)
- Amonia (E Merck)

4.2 Alat Penelitian

- Spektrofotometer Double Wavelength Double Beam Hitachi 557
- Shaker waterbath Gerhardt
- Rotary Evaporator Buchi-R-114
- Perkulator
- KLT-Densitometer (Camag TLC-scanner 3)
- Tabung venoject
- Disposable sput
- Centrifuge
- Pipet Eppendorf

4.3 Prosedur Kerja

4.3.1 Pembuatan Bahan Uji

Serbuk simplisia daun jambu biji ditimbang seksama sebanyak 500 g, kemudian diekstraksi dengan etanol 70% sebanyak 5 L secara maserasi-perkolasi. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan rotavapour sampai didapatkan volume akhir sama dengan berat serbuk simplisia daun. Setelah itu ekstrak pekat tersebut dikeringkan dengan Cab-O-Sil sebanyak 20 g dan diperoleh ekstrak kering (bulk) yang selanjutnya digunakan sebagai bahan uji dalam penelitian ini.

4.3.2 Uji Kualitatif Senyawa Dalam Ekstrak

Uji kualitatif senyawa dalam ekstrak dilakukan dengan metode KLT-Densitometri. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄, sedangkan fase geraknya adalah kloroform : aseton : asam formiat dengan perbandingan 150: 33 : 25. Sampel dan larutan standar kuersetin ditotolkan dalam satu lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan fase gerak. Setelah itu dibandingkan harga R_f sampel dengan harga R_f standar kuersetin serta diamati profil kromatogram hasil analisis dengan densitometer.

4.3.3 Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Bahan Uji

Penetapan kadar kuersetin dalam bahan uji dilakukan secara KLT-Densitometri. Sebelum dianalisis, sampel dihidrolisis terlebih dahulu dengan cara : 250,0 mg sampel (bulk ekstrak etanol 70% daun jambu biji) ditambah 21 ml metanol dan 0,6 ml HCl 25%, kemudian dihidrolisis selama 30 menit pada suhu 70°C. Hasil hidrolisis ini ditambah metanol sampai volume tepat 25,0 ml.

Sampel yang telah dihidrolisis tersebut ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 10 µl bersama larutan standar kuersetin dengan berbagai konsentrasi (500, 750, 1000, 1250, 1500, dan 1750 ppm) ditotolkan masing-masing sebanyak 2 µl. Selanjutnya lempeng KLT tersebut dieluasi dengan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 17) dan dipayar dengan Densitometer pada panjang gelombang 375 nm untuk mengukur area noda.

4.3.4 Perhitungan Dosis

Berdasarkan studi klinis yang telah dilakukan oleh Harijono Achmad pada pasien demam berdarah di RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang, maka dosis yang dipakai adalah 5,31 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 manusia terhadap tikus :

Manusia dengan BB 50 kg = 0,025 tikus dengan BB 200 g

Dosis kuersetin untuk tikus = $0,025 \times 5,31 \text{ mg}$
 = 0,133 mg / 200 g BB tikus

Pada penelitian ini digunakan tiga macam dosis ekstrak yang berbeda, yaitu setengah dosis, satu dosis, dan dua kali dosis di atas, sehingga diperoleh :

Dosis 1 (setengah dosis) = ekstrak yang setara dengan 0,067 mg kuersetin /
 200 g BB tikus

Dosis 2 (satu dosis) = ekstrak yang setara dengan 0,133 mg kuersetin /
 200 g BB tikus

Dosis 3 (dua dosis) = ekstrak yang setara dengan 0,266 mg kuersetin /
 200 g BB tikus

4.3.5 Pembuatan Sediaan Per Oral

Untuk membuat sediaan yang akan diberikan secara per oral pada tikus, ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan tiga macam dosis yang berbeda tersebut masing-masing dibuat suspensi dalam 0,5% CMC Na.

4.3.6 Perlakuan pada Hewan Coba

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

Kelompok 1 : sebagai kelompok kontrol, diberi suspensi CMC Na 0,5%

Kelompok 2 : sebagai kelompok uji 1, diberi ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan dosis 1 (setara dengan 0,067 mg kuersetin / 200 g BB tikus)

Kelompok 3 : sebagai kelompok uji 2, diberi ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan dosis 2 (setara dengan 0,133 mg kuersetin / 200 g BB tikus)

Kelompok 4 : sebagai kelompok uji 3, diberi ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan dosis 3 (setara dengan 0,266 mg kuersetin / 200 g BB tikus)

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

4.3.7 Uji Hemolitik Komplemen

(1) Prinsip Pengujian

Metode yang digunakan adalah *Total Hemolytic Complement Assay*. Prinsip pengujian dengan metode ini adalah mengukur kemampuan hemolitik dari komplemen terhadap indikator hemolitik, yang terdiri dari sel darah merah domba dan hemolisin. Komponen yang diuji adalah komplemen (Hudson, 1991).

(2) Prosedur Kerja

A. Pembuatan Barbitone Buffer Saline (BBS) Stok

- 1) 4,2502 g NaCl + 0,1375 g Barbital Na dilarutkan dalam 70 ml aquadest
- 2) 0,2875 g Barbital dilarutkan dalam aquadest panas

- 3) 1,0151 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,0 M) dilarutkan dalam 2,5 ml aquadest + 1,5 ml larutan 1,0 M CaCl_2 , kemudian ditambahkan aquadest sampai 5,0 ml
- 4) Dicampur (1) dan (2), kemudian didinginkan sampai suhu kamar
- 5) Ditambahkan 250 μl campuran (3), kemudian ditambahkan aquadest sampai 100,0 ml dan selanjutnya disimpan pada suhu 4°C
- 6) Untuk BBS kerja, BBS Stok diencerkan dengan aquadest lima kali

B. Pengambilan serum tikus

- 1) Diambil darah tikus secara intracardial
- 2) Dimasukkan ke dalam tabung venoject, dan dibiarkan 1-2 jam pada suhu kamar sampai terjadi penggumpalan
- 3) Disentrifus 5 menit, kemudian diambil serum dengan spuit dan disimpan dalam freezer

C. Standarisasi sel darah merah

- 1) Dicuci 4 ml sel darah merah domba (SDMD) sebanyak tiga kali dengan larutan Saline
- 2) Diresuspensikan SDMD tersebut dengan 15 ml BBS
- 3) Dicampurkan 100 μl suspensi SDMD dengan larutan Amonia sampai sel lisis dan ditentukan OD-nya pada panjang gelombang 541 nm (suspensi diatur untuk mendapatkan OD = 0,48-0,50)

D. Pembuatan indikator hemolitik

- 1) Diambil 100 μl suspensi SDMD dan ditambahkan BBS dengan volume sesuai standarisasi OD
- 2) Dipipet 4 ml SDMD tersebut, kemudian ditambahkan 100 μl hemolisin
- 3) Diinkubasi pada suhu 37°C pada shaker waterbath selama 15 menit

E. Pengukuran kemampuan hemolitik komplemen

- 1) Diambil 600 μ l serum tikus yang akan diperiksa dan dimasukkan ke dalam tabung.
- 2) Ditambahkan pada tabung tersebut 300 μ l indikator hemolitik
- 3) Diinkubasi 1 jam pada suhu 37°C pada shaker waterbath
- 4) Didinginkan dalam air es, kemudian disentrifus
- 5) OD dibaca pada panjang gelombang 541 nm

4.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan anava pada tingkat kepercayaan 95%. Analisis anava yang digunakan adalah anava satu arah (*one way anova*) dengan rancangan CRD (*Completely Randomized Design*). Dari hasil perhitungan, apabila didapatkan harga signifikan kurang dari 0,05, maka menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda dapat dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* atau LSD (Daniel, 1995).

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Pembuatan Bahan Uji

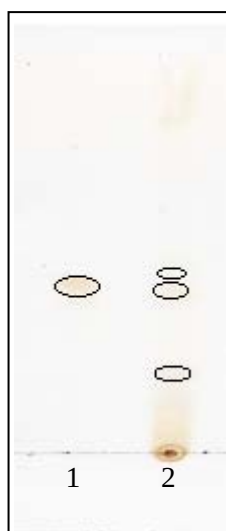
Dari 500 g serbuk simplisia daun jambu biji yang diekstraksi dengan metode maserasi-perkolasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan volume total 5 L, diperoleh hasil seperti yang tercantum pada tabel di bawah ini.

Tabel V.1 Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan metode maserasi-perkolasi

Ekstrak kental (g)	Penambahan cab-O-sil (g)	Ekstrak kering (bulk) (g)
98,6756	20	118,6756

5.2 Uji Kualitatif Senyawa Dalam Ekstrak

Uji kualitatif senyawa-senyawa yang terkandung di dalam ekstrak dilakukan dengan membandingkan nilai R_f dan profil kromatogram dari sampel dan standar pada panjang gelombang 254 nm dan 360 nm. Hasil yang diperoleh dari analisis dengan KLT dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.1 Hasil KLT sampel dan standar kuersetin dengan fase diam silika gel F_{254} ; fase gerak : kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) dan penampak noda radiasi ultraviolet

Keterangan:

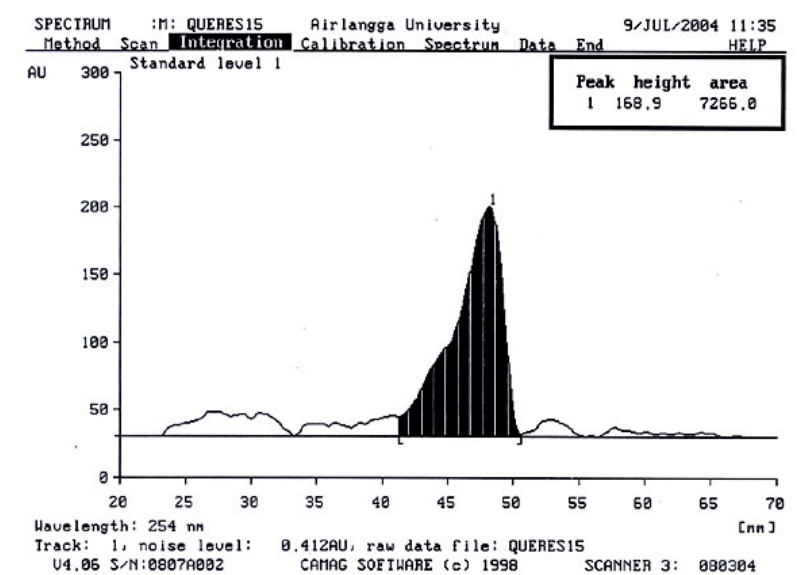
1. Standar kuersetin
2. Sampel (ekstrak etanol 70% daun jambu biji)

Dari hasil KLT di atas, diperoleh nilai R_f sampel dan standar kuersetin seperti yang tercantum pada tabel di bawah ini.

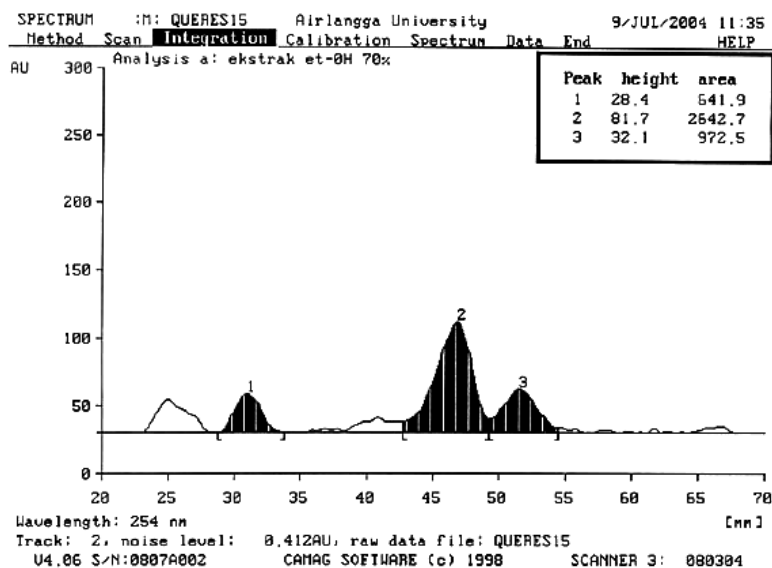
Tabel V.2 Nilai R_f hasil KLT dengan fase diam silika gel F_{254} ; fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25) dan penampak noda radiasi ultraviolet

No	Nilai R_f	
	Standar kuersetin	sampel
1	-	0,20
2	0,42	0,40
3	-	0,46

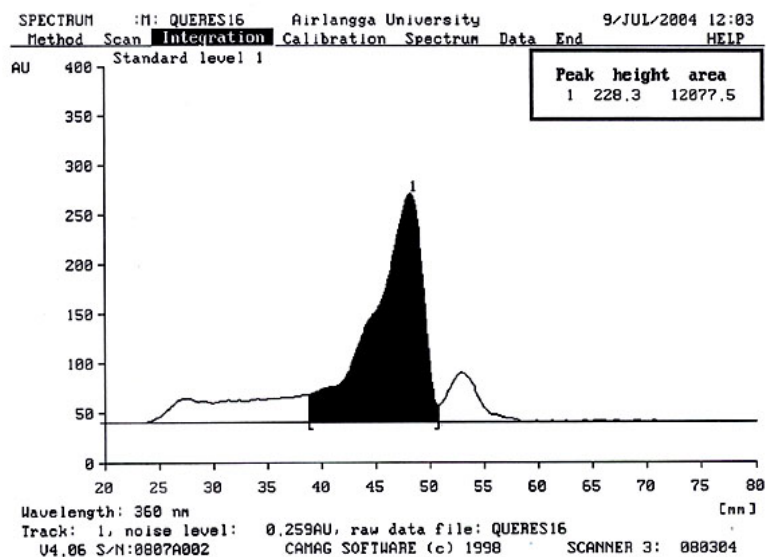
Hasil KLT tersebut dipayar dengan densitometer pada λ 254 nm dan 360 nm, sehingga diperoleh profil kromatogram standar kuersetin dan sampel seperti yang tercantum pada gambar di bawah ini.



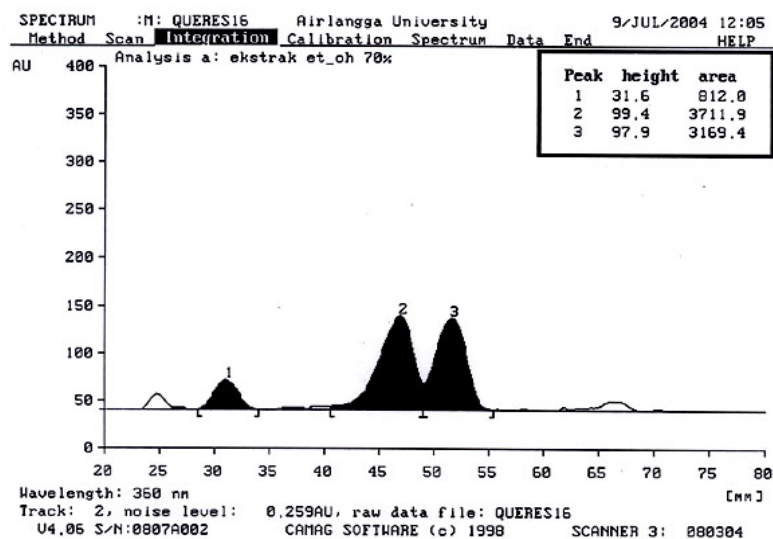
Gambar 5.2 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 254 nm dengan fase diam silika gel F_{254} dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25)



Gambar 5.3 Profil kromatogram kandungan senyawa dalam sampel (ekstrak etanol 70% daun jambu biji) pada λ 254 nm dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25)



Gambar 5.4 Profil kromatogram standar kuersetin pada λ 360 nm dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25)



Gambar 5.5 Profil kromatogram kandungan senyawa dalam sampel (ekstrak etanol 70% daun jambu biji) pada λ 360 nm dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150:33:25)

5.3 Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Bahan Uji

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

Tabel V.3 Kadar kuersetin dalam ekstrak etanol 70% daun jambu biji yang diukur dengan metode KLT-Densitometri

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

Berdasarkan penetapan kadar kuersetin dalam bahan uji, diketahui bahwa ekstrak etanol 70% daun jambu biji tersebut mengandung kuersetin sebesar 2,46%. Dari data tersebut dapat dihitung dosis yang akan diberikan pada tikus, yaitu :

$$\text{Dosis 1} = 0,067/2,46 \times 100 \text{ mg} = 2,724 \text{ mg ekstrak / 200 g BB tikus}$$

$$\text{Dosis 2} = 0,133/2,46 \times 100 \text{ mg} = 5,407 \text{ mg ekstrak / 200 g BB tikus}$$

$$\text{Dosis 3} = 0,266/2,46 \times 100 \text{ mg} = 10,813 \text{ mg ekstrak / 200 g BB tikus}$$

Untuk membuat sediaan uji yang akan diberikan secara per oral pada tikus, ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan tiga macam dosis yang berbeda tersebut masing-masing dibuat suspensi dalam CMC Na 0,5%.

5.4 Uji Hemolitik Komplemen

Data *Optical Density* (OD) dari uji hemolitik komplemen ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan berbagai dosis dapat dilihat pada tabel V.4.

Tabel V.4 Rekapitulasi data *Optical Density* (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen dari berbagai kelompok perlakuan

Nomor tikus	OD pada $\lambda = 541 \text{ nm}$			
	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
1	0,536	0,455	0,325	0,288
2	0,505	0,396	0,392	0,443
3	0,370	0,372	0,358	0,286
4	0,459	0,468	0,327	0,278
5	0,410	0,543	0,314	0,380
Total	2,280	2,234	1,716	1,675
Rata-rata	0,456	0,447	0,343	0,335
SD	0,068	0,070	0,032	0,073

Keterangan :

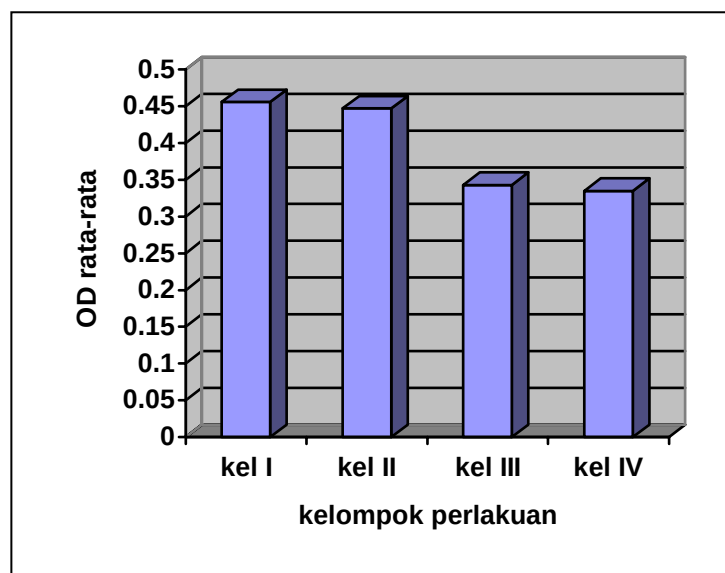
Kelompok I : kontrol (CMC Na 0,5%)

Kelompok II : dosis 1 (2,724 mg / 200 g BB tikus)

Kelompok III : dosis 2 (5,407 mg / 200 g BB tikus)

Kelompok IV : dosis 3 (10,813 mg / 200 g BB tikus)

Bila dilihat dari harga OD rata-rata, terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan, di mana dengan peningkatan dosis ekstrak etanol 70% daun jambu biji, harga OD rata-rata semakin menurun. Penurunan harga OD rata-rata tersebut menunjukkan adanya penurunan aktivitas komplemen. Hal ini dapat dilihat pada gambar 5.6.



Gambar 5.6 Penurunan harga rata-rata *Optical Density* (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen dari berbagai kelompok perlakuan

Keterangan :

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

Kelompok II : dosis 1 (2,724 mg / 200 g BB tikus)

Kelompok III : dosis 2 (5,407 mg / 200 g BB tikus)

Kelompok IV : dosis 3 (10,813 mg / 200 g BB tikus)

Dari data penurunan harga OD rata-rata di atas dapat dihitung persentase penurunan aktivitas komplemen dari berbagai kelompok perlakuan, seperti yang tampak pada tabel V.5.

Tabel V.5 Persentase penurunan aktivitas komplemen dari berbagai kelompok perlakuan

No	Kelompok perlakuan	Penurunan aktivitas komplemen (%)
1	Kelompok I	0
2	Kelompok II	1,97
3	Kelompok III	24,78
4	Kelompok IV	26,54

Keterangan :

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

Kelompok II : dosis 1 (2,724 mg / 200 g BB tikus)

Kelompok III : dosis 2 (5,407 mg / 200 g BB tikus)

Kelompok IV : dosis 3 (10,813 mg / 200 g BB tikus)

Selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan anava satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel V.6 Hasil uji anava satu arah ($\alpha = 0,05$) dari data *Optical Density* (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen

Sumber variasi	Jumlah kuadrat (SS)	Derajat bebas (df)	Kuadrat rata-rata (MS)	F	Sig.
Antar dosis	6,344E-02	3	2,115E-02	5,469	0,009
Antar perlakuan	6,186E-02	16	3,866E-03		
Total	0,125	19			

Dari perhitungan anava diketahui bahwa harga signifikansi $< 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa 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 dari data *Optical Density* (OD) sel darah merah domba yang lisis pada uji hemolitik komplemen

	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
Kelompok I		9,2000E-03 S = 0,818	0,11280* S = 0,011	0,12100* S = 0,007
Kelompok II			0,10360* S = 0,018	0,11180* S = 0,012
Kelompok III				8,2000E-03 S = 0,837
Kelompok IV				

Keterangan :

- Kelompok I : kontrol (CMC Na 0,5%)
- Kelompok II : dosis 1 (2,724 mg / 200 g BB tikus)
- Kelompok III : dosis 2 (5,407 mg / 200 g BB tikus)
- Kelompok IV : dosis 3 (10,813 mg / 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 signifikansi antar kelompok pada kolom dan lajur

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap aktivitas komplemen pada tikus, langkah pertama yang dilakukan adalah pembuatan ekstrak. Simplisia daun jambu biji dibuat serbuk dengan mesin penggiling dengan tujuan agar didapatkan hasil ekstraksi yang optimal. Setelah itu serbuk daun jambu biji diekstraksi dengan pelarut etanol 70% secara maserasi-perkolasi. Metode maserasi-perkolasi dipilih karena metode ini memiliki banyak keuntungan, antara lain dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah besar. Selain itu, pada proses perkolasi terjadi reaksi yang berjalan ke kanan, artinya setelah zat aktif mengadakan kesetimbangan dengan pelarut, zat aktif tersebut tidak akan berdifusi kembali ke dalam sel, karena adanya proses pengaliran dari miscella (sampel yang terlarut). Hal ini menyebabkan sebagian besar zat aktif akan terekstraksi.

Setelah didapatkan ekstrak cair sebagai hasil perkolasi, kemudian ekstrak cair tersebut dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh volume yang sama dengan berat serbuk simplisia daun yang digunakan. Adapun tujuan dari pemekatan ini adalah untuk menarik pelarut yang ada di dalam ekstrak sehingga ekstrak mudah dikeringkan. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan penambahan cab-o-sil sebanyak 20 g. Bahan tambahan cab-O-sil ini dipilih sebagai pengering karena telah terbukti bahwa cab-O-sil mampu menyerap air/uap air yang cukup banyak. Dari 500 g serbuk simplisia daun dengan volume total pelarut (etanol 70%) yang dibutuhkan sebanyak 5 L, diperoleh ekstrak kering (bulk) sebanyak 118,6756 g, yang selanjutnya digunakan sebagai bahan uji pada penelitian ini.

Selanjutnya dilakukan uji kualitatif untuk mengetahui profil kandungan senyawa dalam ekstrak etanol 70% daun jambu biji (bahan uji), terutama untuk mengetahui adanya senyawa kuersetin di dalam bahan uji, yang digunakan sebagai senyawa marker untuk perhitungan dosis. Metode yang digunakan untuk uji kualitatif ekstrak ini adalah KLT-Densitometri. Dari hasil KLT dengan fase diam silika gel F₂₅₄; fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 25)

dan penampak noda radiasi ultraviolet, diperoleh nilai Rf standar kuersetin 0,42, sedangkan pada sampel diperoleh tiga macam nilai Rf, yaitu 0,40; 0,46 dan 0,20. Salah satu nilai Rf sampel sama dengan standar, berarti dalam ekstrak tersebut terdapat senyawa yang identik secara KLT dengan standar kuersetin. Selanjutnya hasil KLT ini dipayar dengan densitometer pada panjang gelombang 254 nm dan 360 nm. Hasil densitometri dari KLT tersebut menunjukkan bahwa salah satu dari tiga jarak puncak profil kromatogram sampel sama dengan jarak puncak profil kromatogram standar kuersetin. Dari hasil uji kualitatif ini diketahui bahwa di dalam ekstrak etanol 70% daun jambu biji terdapat kuersetin dan senyawa lain.

Penggunaan kuersetin sebagai senyawa marker dalam penelitian ini, karena hasil penelitian yang dilakukan oleh Kanyanga Cimanga menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari daun *Morinda morindoides*, yang antara lain mengandung senyawa kuersetin, kuersitrin dan rutin memiliki aktivitas anti komplemen secara in vitro (Cimanga, 1995), sehingga diduga senyawa kuersetin juga memiliki aktivitas anti komplemen.

Penetapan kadar kuersetin dilakukan dengan metode KLT-Densitometri pada $\lambda = 375$ nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum dari kuersetin. Dari penetapan kadar ini diperoleh kandungan kuersetin sebesar 2,46%.

Selanjutnya dilakukan perhitungan dosis bahan uji yang akan diberikan kepada hewan coba. Pada penelitian ini digunakan tiga macam dosis, yaitu dosis 1 (2,724 mg ekstrak / 200 g BB tikus), dosis 2 (5,407 mg ekstrak / 200 g BB tikus), dan dosis 3 (10,813 mg ekstrak / 200 g BB tikus). Bahan uji dengan berbagai dosis tersebut diberikan pada tikus selama enam hari untuk mengetahui pengaruhnya terhadap aktivitas sistem komplemen pada tikus tersebut.

Sistem komplemen adalah bagian yang penting dari pertahanan tubuh normal. Sistem ini merupakan salah satu respon imun nonspesifik. Didalam pertahanan tubuh yang normal, komplemen memiliki fungsi antara lain : pertama, menyelubungi partikel-partikel, seperti kompleks imun, dengan komponen-komponen tertentu komplemen mempermudah ingesti partikel tersebut oleh sel-sel fagosit (fungsi opsonik komplemen). Kedua, menghasilkan banyak produk pecahan protein komplemen untuk reseptor-reseptor positif yang terdapat pada berbagai macam sel-sel inflamatoris (fungsi inflamatoris komplemen). Ketiga,

protein-protein berdaya lambat dari kaskade komplemen membentuk kompleks serangan membran makromolekuler yang menyebabkan kematian sel sasaran (Bellanti,1993).

Aktivasi komplemen dapat melalui dua jalur, yaitu jalur klasik dan jalur alternatif, kemudian keduanya menuju ke jalur terminal bersama yang dikenal dengan jalur serangan membran. Selanjutnya jalur serangan membran tersebut akan merusak sel target. Produk aktivasi komplemen lainnya adalah anafilatoksin, yang menyebabkan pelepasan mediator peptida sehingga terjadi beberapa reaksi biologis seperti peningkatan permeabilitas vaskular, fagositosis dan penarikan leukosit (Bellanti,1993).

Aktivitas komplemen yang normal sangat penting dalam pertahanan tubuh, tetapi apabila aktivitasnya meningkat (berlebihan) justru akan merugikan tubuh. Seperti pada kasus demam berdarah dengue, aktivitas komplemen yang meningkat akan menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular sehingga terjadi kebocoran plasma yang sangat berbahaya bagi pasien, karena dapat berkembang cepat menjadi syok dan kematian. Oleh karena itu, aktivitas komplemen yang berlebihan tersebut harus diturunkan.

Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap aktivitas komplemen. Hasil studi klinis yang dilakukan oleh Harijono Achmad menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji efektif untuk pengobatan demam berdarah dengue (Achmad, 2001), sehingga diharapkan ekstrak tersebut juga dapat menurunkan aktivitas komplemen yang terlalu meningkat pada pasien DBD

Pada penelitian ini, pengujian aktivitas komplemen yang dipilih adalah jalur klasik, karena jalur klasik diaktivasi oleh adanya kompleks imun sedangkan jalur alternatif dirangsang oleh kompleks polisakarida ragi (*zymosan*), produk bakteri, dan eritrosit kelinci. Hal ini disesuaikan dengan aktivasi komplemen yang terjadi pada pasien demam berdarah dengue, yaitu melalui jalur klasik. Aktivasi tersebut terjadi melalui mekanisme sebagai berikut : virus dengue yang masuk ke dalam tubuh pasien dianggap sebagai antigen yang akan membentuk kompleks imun dengan antibodi. Selanjutnya kompleks imun tersebut akan mengaktivasi sistem komplemen jalur klasik.

Metode yang sesuai untuk mengetahui interaksi senyawa-senyawa dengan komplemen pada jalur klasik adalah uji hemolitik total in vitro (Dey, 1991). Pengujian hemolitik total komplemen dimaksudkan untuk mengukur efek total dari komponen C1-C9 yang berinteraksi secara beruntun dan berakhir dengan lisis sel target. Sebagai sel target digunakan sel darah merah domba yang telah disensitisasi. Serum hewan coba yang telah diberi perlakuan digunakan untuk mengukur kemampuan komplemen untuk melisis sel target.

Pada uji aktivitas anti komplemen dari ekstrak etanol 70% daun jambu biji ini digunakan serum tikus sebagai sumber komplemen. Selanjutnya serum tersebut direaksikan dengan sel target. Aktivitas komplemen dalam serum dapat dilihat dari sel target (sel darah merah) yang lisis. Hemolisis ini diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 541 nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum dari hemoglobin. Absorban dari hemoglobin ini menunjukkan jumlah sel darah merah yang lisis, yang berarti juga menunjukkan aktivitas komplemen dalam serum.

Dari hasil uji hemolitik komplemen didapatkan harga OD rata-rata untuk masing-masing kelompok sebesar : 0,456 (kontrol); 0,447 (dosis 1); 0,343 (dosis 2); dan 0,335 (dosis 3). Bila dilihat dari harga OD rata-rata tersebut tampak adanya perbedaan antar kelompok perlakuan. Namun, perlu dilakukan uji statistik untuk memastikan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan tersebut.

Hasil uji statistik dengan anava satu arah pada tingkat kepercayaan 95% menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok hewan coba dengan harga signifikansi 0,009 ($p < 0,05$). Hal ini membuktikan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap aktivitas komplemen pada tikus.

Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda bermakna, dilakukan uji LSD. Dari data uji LSD diketahui bahwa kelompok uji yang diberi ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan dosis 1 (2,724 mg / 200 g BB tikus) tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol yang hanya diberi suspensi CMC Na 0,5%. Akan tetapi dari rata-rata harga OD terlihat adanya perbedaan antara kelompok kontrol (0,456) dengan kelompok uji dosis 1 (0,447),

yang menunjukkan adanya penurunan aktivitas komplemen sebesar 1,97%, walaupun secara statistik tidak bermakna.

Kelompok uji dengan dosis 2, yang diberi ekstrak etanol 70% daun jambu biji sebanyak 5,407 mg / 200 g BB tikus, menunjukkan adanya perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Demikian pula halnya dengan kelompok uji dosis 3, yang diberi ekstrak etanol 70% daun jambu biji sebesar 10,813 mg / 200 g BB tikus, terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan dosis 5,407 mg / 200 g BB tikus dan 10,813 mg / 200 g BB tikus dapat menurunkan aktivitas komplemen pada tikus secara bermakna.

Antara kelompok uji, yaitu kelompok dosis 1 dan dosis 2 terdapat perbedaan bermakna dengan harga signifikansi 0,018 ($p < 0,05$). Demikian pula antara kelompok dosis 1 dan dosis 3 terdapat perbedaan bermakna dengan harga signifikansi 0,012 ($p < 0,05$). Sedangkan antara kelompok dosis 2 dan dosis 3 tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$), namun terdapat kecenderungan penurunan aktivitas komplemen sebesar 2,33%.

Bila dilihat dari data persentase penurunan aktivitas komplemen pada kelompok dosis 1, dosis 2, dan dosis 3, yaitu masing-masing sebesar 1,97% ; 24,78% ; dan 26,54%, maka terlihat bahwa dengan peningkatan dosis ekstrak etanol 70% daun jambu biji, yang dihitung berdasarkan kuersetin, aktivitas komplemen semakin menurun. Sehingga kemungkinan kuersetin yang terkandung di dalam ekstrak tersebut berperan dalam penurunan aktivitas komplemen.

Dari analisis data di atas dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% daun jambu biji dengan dosis 5,407 mg / 200 g BB tikus dan 10,813 mg / 200 g BB tikus dapat menurunkan aktivitas komplemen pada tikus ($p < 0,05$)

Meskipun hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun jambu biji dapat menurunkan aktivitas komplemen, tetapi belum diketahui bagaimana mekanisme penurunan aktivitas komplemen oleh ekstrak etanol 70% daun jambu biji dan senyawa aktif apa yang berperan dalam penurunan aktivitas komplemen tersebut. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme penurunan aktivitas komplemen dan mengetahui senyawa aktif yang berperan dalam penurunan aktivitas komplemen tersebut.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% daun jambu biji (*Psidium guajava* L) dengan dosis 5,407 mg/ 200 g BB tikus dan 10,813 mg/ 200 g BB tikus dapat menurunkan aktivitas komplemen pada tikus ($p < 0,05$).

7.2 Saran

Dari hasil penelitian ini masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme penurunan aktivitas komplemen oleh ekstrak etanol 70% daun jambu biji dan mengetahui senyawa aktif yang berperan dalam penurunan aktivitas komplemen tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Litchman, A.H., Pober JS, 1991. ***Cellular and Molecular Immunology***. Philadelphia : WB Saunders company, p. 260-81
- Achmad, H., 2001. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Psidium guajava* Terhadap Jumlah Trombosit pada Penderita Demam Berdarah Dengue di Bangsal Rawat Inap Penyakit Dalam RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang. ***Majalah Kedokteran Universitas Brawijaya***, Vol. 27, No. 1, hal. 1-5
- Aliadi, 1996. ***Tanaman Obat Pilihan***, Jakarta : Yayasan Sidowayah, hal. 79-80
- Anonim, 2003^a. ***Bila Anak Demam, Jangan Mendokteri Sendiri***, <http://www.suaramerdeka.com/harian/0302/08/kot14.htm>, diakses tanggal 4 September 2003
- Anonim, 2003^b. ***Daun Jambu Biji Manjur Untuk Demam Berdarah***, <http://www.pharmashindo.com/Details.asp?ID=030103084659&cat=specials>, diakses tanggal 4 September 2003
- Anonim, 2003^c. ***Rahasia di Balik Kenikmatan Buah dan Sayur***, <http://www.agribisnis.deptan.go.id/pustaka/teknopro/leaflet%20Teknopro%20No.%2025.htm>, diakses tanggal 8 November 2003
- Baratawidjaja, K.G., 1991. ***Imunologi Dasar***, edisi kedua, Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Bellanti, J.A., 1993. ***Imunologi III***, edisi ketiga, Yogyakarta : Gajah Mada University Press, hal. 114-25
- Cimanga, K., Bruyne, T.D., Lasure, A., Poel, B.V., Pieters, L., Berghe, D.V., and Vlietinck, A., 1995. In Vitro Anticomplementary Activity of Constituents from *Morinda morindoides*. ***Journal of Natural Products***, Vol. 58, No. 3, p. 372-8
- Daniel, W.W., 1995. ***Biostatistics, A Foundation for Analysis in The Health Sciences***, Ed. 6th, New York : John Willey&Sons
- Departemen Kesehatan RI, 1995. ***Farmakope Indonesia***, Edisi IV, Jakarta : Departemen Kesehatan RI, hal. 7
- Departemen Kesehatan RI, 1977. ***Materia Medika***, jilid 1, Jakarta : Departemen Kesehatan RI, hal. 90-4
- Departemen Kesehatan RI, 2000. ***Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat***, Jakarta : Departemen Kesehatan RI, hal. 7-11

- Dey, P.M and Harborne, J.B., 1991. **Methods In Plant Biochemistry, Assay for Bioactivity**. Vol.6, London : Academic Press
- Donatus, I.A., 1985. **Toksikologi Dasar**, edisi ketiga, Yogyakarta : Gajah Mada University Press
- Frank, M.M and Fries, L.F., 1991. The Role of Complement in Inflammation and Phagocytosis. **Immunology Today**, Vol. 12, No. 9, p. 322-6
- Gosh, M.N., 1971. **Fundamentals of Experimental Pharmacology**. Calcuta : Scientific Book Agency
- Hadinegoro, S.R.H., Soegijanto, S., Wuryadi, S., Suroso, T., 2002. Tata Laksana Demam Berdarah Dengue pada Anak. Dalam : Hadinegoro, S.R.H., Satari, H.I. (Eds). **Demam Berdarah Dengue**, Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 80-8
- Hargono, D., 2003. Beberapa Hasil Penelitian yang Mendukung Manfaat Tumbuhan Jambu Biji (*Psidium guajava* L). **Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia**, Vol. 1, No.1, hal 32-8
- Hendarwanto, 1999. Dengue. **Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam**, edisi ketiga, Jakarta : Balai Penerbit FKUI, hal. 417-26
- Hokama, Y. and Nakamura, R.M., 1982. **Immunology and Immunopathology Basic Concepts**, Ed. 1st, Boston : Little Brown and Company
- Hudson, L and Hay, F.C., 1991. **Practical Immunology**, Ed. 3rd, London : Blackwell Scientific Publication, p.264-8
- Kinoshita, T., 1991. Biology of Complement : the Overture. **Immunology Today**, Vol.12, No. 9, p. 291-4
- Kresno, S.B., 1996. **Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium** , edisi ketiga, Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 3-9; 298-306
- Kusumawati, I., 1998. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun *Graptophyllum pictum* (L) Griff Terhadap Respon Imun Nonspesifik Seluler dan Humoral. **Penelitian Dosen Muda**, Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
- Mardisiswojo, S dan Sudarso, H.R., 1985. **Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang**, jilid 1, Jakarta : Balai Pustaka, hal. 86
- Price, S.A., dan Wilson, L.M., 1992. **Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit**, edisi keempat, Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 561-3
- Ritschel, W.A., 1974. **laboratory Manual of Biopharmaceutis and Pharmacokinetics**. Drug Intellegence Publications, Inc

- Soedarmo, S.P., 2002. Masalah Demam Berdarah Dengue di Indonesia. Dalam : Hadinegoro, S.R.H., Satari, H.I. (Eds). **Demam Berdarah Dengue**, Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 1-12
- Steenis, C.G.G.J.V., 1997. **Flora, Untuk Sekolah di Indonesia**, Jakarta : Pradnya Paramita, hal. 315-7
- Stites, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G., 1994. **Basic and Clinical Immunology**, Ed. 8th. New York : Appleton & Lange, p. 187-9
- Sudradjat, 2000. **Demam Berdarah Dengue**, http://www.geocities.com/mitra_sejati_2000/dbd.html, diakses 4 september 2003
- Sugiarso, N.C., 2002. Pengembangan Obat Tradisional Lewat Pendekatan Ethnofarmakologis. **Jornal Obat Bahan Alam (Journal of Natural Medicine)**, Vol.1, No. 1, hal. 1-12
- Sumarmo, 1990. Demam Berdarah Dengue, Aspek Klinis dan Penatalaksanaan. **Cermin dunia kedokteran**, No. 60, hal. 3-8
- Sukana, B., 1993. Pemberantasan Vektor Demam Berdarah Dengue di Indonesia. **Media Litbangkes**. Vol. 3, No. 1, hal. 10-1
- Suroso, T., 1990. Demam Berdarah Dengue ; Situasi, Masalah dan Program Pemberantasannya di Indonesia. **Laporan Semiloka**, Jakarta : Pusat penelitian kesehatan lembaga penelitian UI
- Sutaryo, 2002. Perkembangan Patogenesis Demam Berdarah Dengue. Dalam : Hadinegoro, S.R.H., Satari, H.I. (Eds). **Demam Berdarah Dengue**, Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 32-43
- Sutrisno, B., 1983. **Tanaman Obat Keluarga**, Jakarta : Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Departemen Kesehatan RI
- Tjitrosoepomo, G., 1988. **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)**, Yogyakarta : Gajah Mada University Press, hal. 219-22
- Wijayakusuma, H., 1994. **Tanaman Obat Berkasiat di Indonesia**, jilid kedua, Jakarta : Pustaka Kartini, hal. 61-3
- WHO, 1999. **Demam Berdarah Dengue ; Diagnosis, Pencegahan, Pengobatan, dan Pengendalian**, edisi kedua, Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 10-6
- Wuryadi, S., 1990. Pengamatan Virus Dengue dan Penderita DBD di Indonesia tahun 1975-1988. **Laporan Semiloka**, Jakarta : Pusat penelitian kesehatan lembaga penelitian UI

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 : Psidii folium
 Asal simplisia : Agronomi
 Tanggal penerimaan : 31 maret 2003
 Tanggal pemeriksaan : 10-12 April 2003
 Pustaka : MMI. 1977

No PEMERIKSAAN	SPESIFIKASI/ SYARAT	HASIL
1. PEMERIAN - 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 Psidii Folium.

Mengetahui,



(On/rapho Maar)

Lampiran 2

Hasil Anava Satu Arah ($\alpha = 0,05$) dari Harga *Optical Density* (OD) Sel Darah Merah Domba yang Lisis pada Uji Hemolitik Komplemen

Oneway

Descriptives

OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol negatif	5	.45600	6.7679E-02	3.03E-02	.37196	.54004	.370	.536
dosis 1	5	.44680	6.6983E-02	3.00E-02	.36363	.52997	.372	.543
dosis 2	5	.34320	3.1807E-02	1.42E-02	.30371	.38269	.314	.392
dosis 3	5	.33500	7.3396E-02	3.28E-02	.24387	.42613	.278	.443
Total	20	.39525	8.1208E-02	1.82E-02	.35724	.43326	.278	.543

Test of Homogeneity of Variances

OD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.419	3	16	.274

ANOVA

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.344E-02	3	2.115E-02	5.469	.009
Within Groups	6.186E-02	16	3.866E-03		
Total	.125	19			

Lampiran 3

Hasil Uji LSD dari Harga *Optical Density* (OD) Sel Darah Merah Domba yang Lisis pada Uji Hemolitik Komplemen

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD

LSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	dosis 1	9.2000E-03	3.93E-02	.818	-7.41689E-02	9.2569E-02
	dosis 2	.11280*	3.93E-02	.011	2.9431E-02	.19617
	dosis 3	.12100*	3.93E-02	.007	3.7631E-02	.20437
dosis 1	kontrol negatif	-9.200E-03	3.93E-02	.818	-9.25689E-02	7.4169E-02
	dosis 2	.10360*	3.93E-02	.018	2.0231E-02	.18697
	dosis 3	.11180*	3.93E-02	.012	2.8431E-02	.19517
dosis 2	kontrol negatif	-.11280*	3.93E-02	.011	-.19617	-2.94311E-02
	dosis 1	-.10360*	3.93E-02	.018	-.18697	-2.02311E-02
	dosis 3	8.2000E-03	3.93E-02	.837	-7.51689E-02	9.1569E-02
dosis 3	kontrol negatif	-.12100*	3.93E-02	.007	-.20437	-3.76311E-02
	dosis 1	-.11180*	3.93E-02	.012	-.19517	-2.84311E-02
	dosis 2	-8.200E-03	3.93E-02	.837	-9.15689E-02	7.5169E-02

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

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 Data Kadar Standar Kuersetin dan Area Puncak Hasil Analisis dengan KLT-Densitometer pada λ 375 nm dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (150 : 33 : 17)

Kadar kuersetin (ppm)	Area puncak
506,667	1696,5
760,000	5195,8
1013,333	7238,4
1266,667	10422,9
1520,000	12809,7
1773,333	14849,6

Dari data di atas diperoleh persamaan regresi linier untuk kurva baku :

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

$$r = 0,996805$$

Lampiran 5

Tabel Perbandingan Luas Permukaan Tubuh Beberapa Hewan Coba dan Manusia untuk Perhitungan Dosis

	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 :

- ◆ Data di atas digunakan untuk menentukan dosis sediaan uji yang akan diberikan pada tikus.
- ◆ 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.