



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA**
Local Project Implementation Unit (LPIU)
DUE-Like Batch III



LAPORAN PENELITIAN

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAHAN AKTIF *Phyllanthus niruri L*
SEBAGAI IMMUNOSTIMULATOR SPESIFIK
DALAM UPAYA Mencari OBAT ANTISTERILITAS**

Drh. Moh. Sukmanadi, M.Kes.
Drh. Lilik Maslachah, M.Kes.
Drh. Rahmi Sugihartuti, M.Kes.

006907191

(*Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga*, dibiayai oleh Proyek DUE-Like Batch III , Nomor Kontrak : 59 / PL /DUE-Like/UA/2003, 17 September 2003).

**PROYEK DUE – Like Batch III
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Desember 2003**



**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN HIBAH PENELITIAN
PROYEK DUE –Like Batch III**

Judul

Isolasi dan Identifikasi Bahan Aktif *Phyllanthus niruri L* sebagai Immunostimulator Spesifik Dalam Upaya mencari Obat Antisterilitas

Ketua Peneliti

Nama : Drh. Moh. Sukmanadi, M.Kes.
Jenis Kelamin : Laki-laki
Pangkat/Golongan : Penata Muda /IIIa
NIP : 132 087 866
Jabatan : Asisten Ahli
Fakultas : Kedokteran Hewan
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu Penelitian : 6 Bulan

Biaya Penelitian : **Rp. 30.000.000,- (Tiga Puluh Juta Rupiah)**

Surabaya, 1 Desember 2003

Mengetahui,
Dehan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Isandiono, Drh.)
NIP. 01301637297

Ketua Peneliti,

(Drh. Moh. Sukmanadi, M.Kes.)
NIP. 132 087 866

Menyetujui,
Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga



(Titi Sri Tjahjandari, Ph.D)
NIP. 131 801 627

KATA PENGANTAR

Segala puji dan rasa syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, pencipta alam semesta, penguasa jagat raya atas limpahan rahmat dan hidayah Nya sehingga penulis dapat merampungkan penelitian yang mengambil judul : **Isolasi dan Identifikasi Bahan Aktif *Phyllanthus niruri L* sebagai Immunostimulator Spesifik Dalam Upaya mencari Obat Antisterilitas**

Dengan rasa hormat dan setulus hati penulis haturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi atas pemberian Dana Hibah Penelitian DUE-Like Batch III di Universitas Airlangga
2. Prof. Dr. Med. Puruhito selaku Rektor Universitas Airlangga
3. Prof. Dr. Ismudiono, Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan persetujuan atas penelitian ini
4. Nuraini Farida, Dra. M. S., AFK., selaku Kepala Laboratorium Ilmu Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta seluruh staf yang telah membantu prasarana dan sarana demi kelancaran penelitian.
5. Tjitjiek Srie Tjahjandari, Ph.D. selaku Direktur LPIU Unair.
6. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. selaku PIC Hibah Penelitian dan Kepala Lab. Biologi Molekuler Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
7. Retno Bijanti, M.S., Drh. selaku Koordinator DUE-Like Batch III Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
8. Semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberi peran terhadap kelancaran penelitian hingga pembuatan laporan.

Akhirul kata penulis berharap semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukannya, Amin.

Surabaya, 1 Desember 2003

Penulis

RINGKASAN

Isolasi & Identifikasi Bahan Aktif *Phyllanthus niruri L* sebagai Immunostimulator Spesifik Dalam Upaya Mencari Obat Antisterilitas (Moh. Sukmanadi, Lilik Maslachah, Rahmi Sugihartuti, 2003, 45 halaman)

Phyllanthus niruri L (meniran) dalam pemakaian empiris tradisional berkaitan dengan sistem imun, misalnya untuk penyakit kuning, diduga bersifat imunostimulan, diperlukan suatu pendekatan interdisipliner dan terpadu sebagai eksplorasi ilmiah bersifat interdisipliner terhadap zat aktif biologi yang dipergunakan secara tradisional.

Penelitian menggunakan pengujian imunomodulasi, karena pengujian semacam ini terhadap tanaman obat merupakan usaha baru dan di Indonesia pengujian ini belum banyak dilakukan orang.

Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* secara per-oral pada mencit berpengaruh pada fungsi dan aktivitas sistem imun sebagai Immunostimulator dengan cara peningkatan aktivitas monosit/makrofag fagositosis, kemotaksis serta sekresi beberapa sitokin pada sel-sel imunogenik, antara lain TNF α (*Tumor Necrosis Factor*).

Efek *Phyllanthus niruri L* terhadap respon imun pada sel-sel imunokompeten melalui pengaruhnya terhadap sekresi beberapa sitokin intra testiskuler belum banyak diketahui.

Orientasi penelitian ini dibatasi pada pemeriksaan zat antara yaitu aktivitas sel imunokompeten dalam testis terutama monosit/makrofag dengan stimulasi sekresi TNF α yang distimuli oleh ekstrak *Phyllanthus niruri L* pada organ reproduksi khususnya testis guna memperbaiki proses spermatogenesis.

Pemeriksaan kadar TNF α dilakukan pada jaringan testis yang dicacah dan dibuat *Whole extract* (protein somatik), selanjutnya dilakukan identifikasi protein dan dianalisis dengan SDS-PAGE. Fragmen protein yang diketahui dibuatkan antibodi (anti mouse TNF α) digunakan untuk *immunoblotting*.

Hasil fraksi protein intra testikular diperoleh masing-masing dengan berat molekul berikut ; 87 kDa, 80 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, dan 26 kDa. Fraksi dengan berat molekul 26 kDa merupakan fraksi dari TNF α . *Phyllanthus niruri L* mampu meningkatkan sekresi TNF α intra testikular yang merupakan komponen sistem imun sehingga bersifat imunostimulan. Perlu penelitian lebih lanjut terhadap masing-masing fraksi protein yang diperoleh guna mengetahui imunokompeten intra testikular lain yang dirangsang sekresinya oleh *Phyllanthus niruri L* serta mekanisme aktivitas imunostimulan *Phyllanthus niruri L*, dengan melakukan pengujian klinis.

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dibiayai oleh Proyek DUE-Like Batch III , Nomor Kontrak : 5a 9 / PL /DUE-Like/UA/2003, 17 September 2003).

SUMMARY

As the use of traditional drugs is increasing in the recent years, hebal extract *Phyllanthus niruri L* has been used as a traditional drugs in Indonesia. This research was conducted to evaluate the effect of extract of *Phyllanthus niruri L* on the immune system components.

The objective of this study to detect the immunostimulatory effects on oral *Phyllanthus niruri L*'s extract treatment to mice (*Mus musculus*).

This study was done by protein isolation and identification by purified protein reaction with polyclonal antibody : Protein destroyed by PBS identified by SDS-PAGE with silver stain, and then protein were transferred to nitrocellulose membrane used polyclonal antibody (Anti-mouse TNF α Polyclonal) were visualized by Ig G goat anti rabbit conjugate and alkaline-phosphatase as a secondary antibody; Detection of protein fraction according to molecular weight, protein isolation by gel electrophoresis; It were done immunoblotting process to get immunogenic protein by western blot.

The result of this study is showed that oral *Phyllanthus niruri L*'s extract treatment could influence the function and activity of immune system component. It has known the antigen protein fraction of whole extract (somatic protein) was MW : 87 kDa, 80 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, and 26 kDa. Identification by western blot technique showed specific protein be estimated in MW 26 kDa is *Tumor Necrosis Factor α* .

From this study can be conclude that the *Phyllanthus niruri L* can be increase *Tumor Necrosis Factor α* (*TNF α*) intratesticular to be useful in intensifying the spermatogenesis, considered as an immunostimulator.

Key word : *Phyllanthus niruri L*, Immunogenic protein, Immunostimulator,

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
KATA PENGANTAR	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	5
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB IV METODE PENELITIAN	15
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	22
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	34

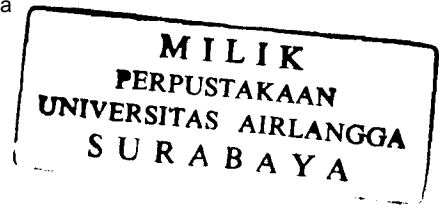
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1 Hasil elektroforesis <i>whole extract</i> (Protein Somatik) testis mencit	22
Gambar 5. 2 Hasil <i>Immunoblotting whole extract</i> (Protein Somatik) testis mencit	23
Gambar 5.3 Hasil <i>Dot Blot</i> menggunakan Konjugat <i>Ig G goat anti rabbit-AP</i> (<i>alkaline phosphatase</i>) dan substrat <i>Western Blue</i>	28



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penentuan Berat Molekul	34
Lampiran 2. Penentuan Berat Molekul Sumuran kolom 2-3	35
Lampiran 3. Penentuan Berat Molekul Sumuran kolom 6-7	36
Lampiran 4. Grafik Kurva Standart	37
Lampiran 5. Grafik <i>Whole extract</i> Protein Sumuran kolom 2-3	38
Lampiran 6. Grafik <i>Whole extract</i> Protein Sumuran kolom 6-7	39
Lampiran 7. Bahan – bahan yang digunakan	40
Lampiran 8. Prosedur Elektroforesis	42
Lampiran 9. Diagram Alir SDS-PAGE	43
Lampiran 10. Diagram Alir Western Blot	44
Lampiran 11. Diagram Alir Dot Blot	45



BAB I PENDAHULUAN

Latar Belakang

Perkembangan ilmu dan teknologi kedokteran dalam kurun waktu sekarang ini berjalan sangat pesat, manajemen terapi standart internasional kedokteran mengarah pada target subseluler, target terapi berubah menuju tingkat biomolekuler.

Dalam dasa warsa sekarang ini, kecenderungan masyarakat global untuk *back to root* nampak dengan indikasi meningkatnya kebutuhan konsumsi produk kesehatan bahan – bahan yang berasal dari alam .

Penggunaan obat tradisional (tanaman obat dan obat asli indonesia) masih berlangsung pada sebagian besar masyarakat Indonesia. Sejarah membuktikan bahwa pemanfaatan tanaman berkhasiat obat mempunyai peranan yang penting dalam penggunaan obat-obatan yang ada dewasa ini.

Tanaman obat yang banyak digunakan dalam pengobatan tradisional beberapa di antaranya mempunyai indikasi pemakaian empiris berkaitan dengan sistem imun. Simplisia suatu tanaman harus memenuhi standarisasi yang tercantum dalam MMI (Materia Medika Indonesia) agar dapat digunakan sebagai bahan obat untuk pengobatan tradisional. Wydiawaruyanti (1993), melakukan penelitian standarisasi simplisia herba *Phyllanthus niruri L* , memperoleh hasil bahwa herba *Phyllanthus niruri L* memenuhi persyaratan sesuai MMI.

Phyllanthus niruri L dalam pemakaian empiris tradisional berkaitan dengan sistem imun, misalnya untuk penyakit kuning, diduga bersifat imunostimulan. Sehingga diperlukan suatu pendekatan interdisipliner dan terpadu yang dirumuskan sebagai eksplorasi ilmiah

yang bersifat interdisipliner terhadap zat aktif biologi yang dipergunakan secara tradisional (Sugiarso, 2002).

Phyllanthus terutama berisi lignan, alkaloid, dan Bioflavonoid. Belum diketahui bahan apa yang mempunyai efek sebagai anti virus, kebanyakan obat anti virus bekerja dalam sistem imun (Thyagarajan, et al. 1988).

Tanaman obat *Phyllanthus niruri L* telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional. Ekstrak tanaman ini banyak digunakan dalam pengobatan sehari-hari sebagai imunostimulator. Pemakaian dalam jangka panjang akan mempengaruhi aktivitas sel imunokompeten berbagai organ, termasuk organ reproduksi.

Seiring dengan berkembangnya bidang imunologi, penelitian ini menggunakan pengujian imunomodulasi, karena pengujian semacam ini terhadap tanaman obat merupakan usaha baru pada dasa warsa terakhir ini, di Indonesia pengujian ini belum banyak dilakukan orang (Zhang, 1995).

Imunomodulator tidak menyebabkan terjadinya respon imun humoral maupun seluler atau bukan suatu antigen, melainkan menyebabkan modulasi dari respon imun berupa stimulasi atau supresi.

Imunomodulator mempunyai efek positif atau negatif terhadap sistem imun sehingga mempunyai efek terapi khusus yang berkaitan dengan mekanisme sistem imun, dengan demikian dapat digunakan sebagai terapi terhadap penyakit-penyakit yang berkaitan dengan sistem imun seperti ; infeksi, keganasan, autoimun dan gangguan fungsi sistem imun yang lain (Jaffe, 1991; Zhang, 1995; Chirigos, 1992).

Pada hewan percobaan mencit, pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* secara per-oral menunjukkan pengaruh pada fungsi dan aktivitas sistem imun sebagai Imunostimulator

dengan cara peningkatan aktivitas monosit/makrofag fagositosis, kemotaksis serta sekresi beberapa sitokin pada sel-sel imunogenik, antara lain TNF α (*Tumor Necrosis Factor*).

TNF α dapat mengaktivasi monosit/makrofag untuk melepaskan IL-1 (Interleukin-1), IL-6 (Interleukin-6) dan TNF α sendiri (Maat, 1997)

Xiong (1993); TNF α merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag, TNF α dapat menghambat *luteinizing hormone* dengan induksi sintesis hormon testosteron oleh sel Leydig yang berbanding lurus, semakin besar kadar TNF α semakin kuat inhibisinya.

Reseptor TNF α dideteksi terdapat pada sel somatik testis (sel Leydig) dan sel Sertoli. TNF α mempunyai peran penting dalam pengaturan hormonal pada testis. Pada sel Leydig TNF α dapat menginduksi sintesis testosteron dan menghambat LH (*luteinizing hormone*). Pada sel sertoli dapat menginduksi sintesis inhibin yang menghambat FSH (*Follicle Stimulating Hormone*). TNF α berperan penting pada fungsi testis; seperti spermatogenesis, pengaturan proses steroidogenesis dan interaksinya dengan sistem imun (Benahmed, 1997).

Keberhasilan suatu proses reproduksi, membutuhkan proses spermatogenesis, anatomi reproduksi dan fungsi yang normal (Jaffe and Jewelewicz, 1991). Penelitian ini dibatasi pada pemeriksaan zat antara yaitu aktivitas sel imunokompeten dalam testis terutama monosit/makrofag dengan stimulasi sekresi TNF α yang distimuli oleh ekstrak *Phyllanthus niruri L* pada organ reproduksi khususnya testis, karena testis merupakan organ yang penting dalam sistem reproduksi.

Permasalahan yang ada sekarang adalah belum banyak diketahui efek *Phyllanthus niruri L* terhadap respon imun pada sel-sel imunokompeten melalui pengaruhnya terhadap sekresi beberapa sitokin intra testiskuler.

Isolasi dan identifikasi bahan aktif yang dimaksud dalam penelitian ini adalah mengeksplorasi zat protein anti-anti TNF α dengan merangsang zat tersebut pada mencit jantan setelah itu zat protein tersebut diisolasi dari hewan coba, tidak dimaksud mengisolasi bahan aktif dari *Phyllanthus*, hal ini disebabkan pada penggunaan klinis yang paling efektif adalah zat anti dari bahan uji biologik, sedangkan obat antisterilitas yang dimaksud adalah pengobatan pada gangguan spermatogenesis.



BAB II TUJUAN DAN MANFAAT

II.1 TUJUAN

Tujuan umum pada penelitian ini adalah :

1. Meningkatkan peran pengobatan tradisional bahan alam yaitu tanaman obat asli Indonesia.
2. Mendukung eksplorasi tanaman obat Indonesia yang berkaitan dengan sistem imun.

Tujuan khusus yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan fraksi protein intra testikular.
2. Mengetahui dan membuktikan bahwa *Phyllanthus niruri L* bersifat imunostimulan.

II.2 MANFAAT

1. Mendukung penelitian dan eksplorasi tanaman obat Indonesia yang berkaitan dengan aspek imunologi.
2. Meningkatkan mutu produk obat alami sehingga status pemakaian (*Phyllanthus niruri L*) dari sifat dogma empiris menjadi dogma klinis yang bersifat ilmiah.

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

III.1 Tanaman *Phyllanthus niruri* Linn (Meniran)

III.1.a Morfologi

Tergolong tanaman perdu, tumbuh tegak, tinggi 50 cm sampai 1 meter, bercabang terpenjar, cabang mempunyai daun tunggal yang berseling dan tumbuh mendatar dari batang pokok. Batang berwarna hijau pucat atau hijau kemerahan. Bentuk daun bundar telur sampai bundar memanjang, panjang daun 5 mm sampai 10 mm, lebar 2,5 mm sampai 5 mm, ujung bundar atau runcing, permukaan daun bagian bawah berbintik-bintik kelenjar. Bunga keluar dari ketiak daun; bunga jantan terletak di bawah ketiak daun, berkumpul 2 bunga sampai 4 bunga, gagang bunga 0,5 mm sampai 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bundar telur terbalik, panjang 0,75 mm sampai 1 mm, berwarna merah pucat; bunga betina sendiri, letaknya dibagian atas ketiak daun, gagang bunga 0.75 mm sampai 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bundar telur sampai bundar memanjang, tepi berwarna hijau muda, panjang 1,25 mm sampai 2,5 mm. Buah licin, garis tengah 2 mm sampai 2,5 mm, panjang gagang buah 1,5 mm sampai 2 mm. Seluruh bagian tanaman dapat digunakan untuk tujuan terapi (Bharatiya, 1992).

Ekologi dan penyebaran, tumbuh tersebar di seluruh wilayah Indonesia pada ketinggian tempat antara 1 m sampai 1.000 m di atas permukaan laut. Tumbuh liar di tempat terbuka, pada tanah gembur yang mengandung pasir, di ladang, di tepi sungai dan di pantai, terdapat pula di India, Cina, Malaysia, Filipina dan Australia (Heyne, 1987 dan Syamsul dkk, 1991).

III.1.b Klasifikasi *Phyllanthus niruri* Linn :

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub kelas	: Monoclamidae
Ordo	: Euphorbiales
Familia (Suku)	: Euphorbiaceae
Genus (Marga)	: <i>Phyllanthus</i>
Spesies (Jenis)	: <i>Phyllanthus niruri</i> , LINN

III.1.c Kandungan kimia

Kandungan kimia tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) terutama berisi **lignan**; *Phyllanthine* dan *Hypophyllanthine* (Thyagarajan et al, 1988), **alkaloid** diberi nama *ent-norcecurinin* (Joshi, 1986). dan **Bioflavonoid**; *quercetin*, ditemukan **lignan** dan **isolignan** baru; *lintetralin*, *isolintetralin*, *nirtetralin*, *nirphyllin* dan *phyllnirurin* (Singh, 1989). Subarnas dan Sidik (1993) juga menyebutkan bahwa herba *Phyllanthus niruri* Linn mengandung senyawa dari golongan **flavonoid** yaitu *quercetin*, *quercitrin*, *isoquercitrin*, *astragalin*, *rutin*, *kaempferol-4-Rhamnopyranoside*, *erydictyol-7-rhamnopyranosid*, *festin-4-o-glucoside* dan *nirurin*; **Lignan** yang terdiri dari *phyllanthin*, *hypphyllanthin* dan *triterpene lup-20(29)-en-3-ol*.

III.1.d Peran imunostimulator *Phyllanthus niruri* L

Tanaman obat yang dalam pemakaian empiris tradisional berkaitan dengan sistem imun, diperkirakan sebagai imunomodulator (Soetarjadi, 1990).

Aspek klinis obat yang tergolong imunostimulan adalah luas, pada kasus-kasus keganasan, infeksi kronis dan kelainan imunologik lainnya, namun jumlah obat yang tergolong imunostimulan masih sangat sedikit, apalagi yang berasal dari tanaman.

Penelitian Maat (1997), pemberian *Phyllanthus niruri L* dapat mempengaruhi sekresi sitokin oleh sel-sel imunogenik pada darah mencit. Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* per oral pada mencit menunjukkan pengaruhnya pada fungsi dan aktivitas sistem imun yaitu sebagai imunostimulator, efek stimulator ini tampak pada meningkatnya sekresi beberapa sitokin oleh sel-sel imunogenik, sitokin tersebut antara lain ialah TNF- α oleh subset Th-1. TNF- α dapat mengaktivasi monosit/makrofag untuk melepas IL-1, IL-6, dan TNF- α itu sendiri.

Phyllanthus niruri L terhadap respon imun spesifik (Maat, 1997); Meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit B, Meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit T, Meningkatkan sekresi IL - 4 oleh subset TH-2, Meningkatkan sekresi TNF α oleh Subset TH-1, meningkatkan produksi antibodi spesifik kelas Ig M dan Ig G, sehingga *Phyllanthus niruri L* dapat disebut sebagai Imunostimulator.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman obat dari genus *Phyllanthus* mempunyai khasiat anti virus Hepatitis B yang diduga bekerja terhadap polimerase endogen dengan cara melakukan *blocking* pada *DNA Polymerase*, sedangkan enzim ini dibutuhkan untuk berkembangnya virus hepatitis B (Thyagarajan, et al. 1988).

sedangkan kebanyakan obat anti virus bekerja sebagai imunostimulator.

Phyllanthus bekerja dengan melakukan *blocking* pada *DNA Polymerase*, dimana enzim ini dibutuhkan untuk berkembangnya virus hepatitis B.

Hasil studi klinis terhadap *Phyllanthus* dengan HBV (*hepatitis B virus*) dilaporkan bahwa spesies *Phyllanthus urinaria* dan *Phyllanthus niruri* L bekerja lebih baik dibandingkan pada *Phyllanthus amarus* (Meixa, et al. 1995).

III.2.a Sistem Imun

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan badan untuk mempertahankan keutuhan tubuh, sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan oleh berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Sistem imun harus mampu melawan patogen intraseluler seperti virus, beberapa bakteri dan protozoa serta patogen ekstraseluler seperti bakteri dan toksinnya, parasit dan virus bebas. (Baratawidjaja, 1991)

Sistem imun tubuh terdiri atas berbagai macam sel dan molekul protein yang saling bekerja sama, mulai dari pengenalan antigen asing (non-self antigen) hingga bangkitnya respon imun dan terbentuknya antibodi maupun sel makrofag aktif.

Sistem imun dibedakan menjadi dua yaitu, **pertama:** natural/alamiah atau non spesifik dan sering juga dikenal dengan istilah *innate immunity*. Sistem ini bekerja secara spontan terhadap substansi asing, tanpa memerlukan pengenalan terlebih dahulu, merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme. Karena tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu, maka sistem ini telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Komponen sistem imun non spesifik adalah: **Pertahanan fisik/mekanik**, yang terdiri dari kulit, sel lendir, silia saluran pernafasan, batuk dan bersin. **Pertahanan biokimia**, yang terdiri dari bahan yang disekresi oleh mukosa saluran pernafasan dan telinga, lisozim (dalam keringat, ludah, air mata dan air susu), laktoferin, dan asam neuraminik (dalam air susu ibu), asam hidroklorid (dalam lambung), enzim proteolitik dan empedu (dalam usus halus), pH yang rendah dari vagina, serta spermin dalam sperma,

bahan yang dilepas leukosit, lisozim yang dilepas makrofag, laktoferin dan transferin (dalam serum). **Pertahanan humoral** yang terdiri atas berbagai bahan dalam sirkulasi, antara lain: komplemen yang berperan dalam meningkatkan fagositosis (opsonisasi) dan mempermudah destruksi bakteri dan parasit. Interferon yang merupakan suatu glikoprotein yang dihasilkan oleh berbagai sel tubuh yang mengandung nucleus. *C-Reactive Protein (CRP)* yang merupakan salah satu contoh dari protein fase akut, yaitu protein yang meningkat kadarnya dalam darah pada saat terjadi infeksi akut. **Pertahanan seluler**, yang berperan dalam pertahanan seluler antara lain: Fagosit yang terdiri dari sel mononuklear (monosit/makrofag), serta sel polimorfonuklear (granulosit) yang berasal dari sel asal hemopoietik. Makrofag, yang mempunyai beberapa granula dan melepaskan berbagai bahan antara lain lisozim, komplemen, interferon, dan sitokin. *Large Granular Lymphocyte (LGL)*, yang sebagian besar menunjukkan sifat sel NK dan *antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC)* dan *cytotoxic T lymphocyte (CTL)*. Kedua adalah sistem imun spesifik yang dapat mengenal substansi asing secara spesifik dan mengeliminasi benda asing secara selektif. Ciri khas dari sistem ini adalah adanya spesifisitas, diversitas, terbentuknya sel memori dan mampu membedakan *self* dan *non-self*. Ketahanan tubuh yang diperoleh melalui sistem ini dinamakan imunitas spesifik/*acquired immunity*, sistem ini terdiri atas: **Sistem imun spesifik humoral**, yang berperan adalah sel B yang berasal dari sel asal multipoten, bila sel B dirangsang oleh benda asing, maka sel tersebut akan berproliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang membentuk antibodi, fungsi utama antibodi adalah pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler virus dan bakteri serta menetralkan toksinnya. **Sistem imun spesifik seluler**, yang berperan dalam sistem ini adalah sel T, fungsi utama dari sel T adalah untuk

pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler, virus, jamur, parasit, dan keganasan (Baratawidjaja, 1991).

III. 2.b Sistem imun pada mencit

Digunakan mencit sebagai hewan percobaan pada sistem imun, karena 60-80% uji biologik menggunakan hewan percobaan mencit dan sistem imun mencit lebih banyak diketahui dibandingkan dengan sistem imun hewan percobaan yang lain.

Sejak 1966 konsep seluler untuk membedakan subpopulasi sel-T pada mencit ditemukan, sejak itu pula mencit digunakan sebagai model untuk meneliti sistem imun seluler pada manusia.

Antigen permukaan sel limfosit mencit yang pertama kali diketemukan adalah antigen *Theta* yang kemudian dikenal dengan nama Thy-1. Antigen ini hanya didapat pada sel T, tidak pada sel B. Sedangkan antigen yang terdapat pada semua sel limfosit mencit adalah Ly, di mana Lyt pada sel T dan Lyb pada sel B. Antigen inilah yang digunakan untuk membedakan subpopulasi limfosit mencit.

III. 3 *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF - α)

Menurut Huleihel et al (1996), sitokin adalah kumpulan dari imunoregulator, *polypeptide growth factors* yang diproduksi oleh bermacam-macam sel secara luas. Sitokin inflamasi, seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α diproduksi terutama oleh makrofag terhadap respon dari antigen asing, infeksi patogen dan aktivasi imunologik.

TNF- α , tidak banyak terlibat dalam pengaturan sistem imun. Mempunyai aktivitas perangsangan yang ganda terhadap limfosit T teraktifkan (*activated lymphocyte*). Demikian juga imunitas spesifik terhadap tumor ditingkatkan oleh TNF- α .

Tumor Necrosis Factor (TNF), dulu dikenal dengan nama limfotoksin. Sumber utama TNF adalah sel fagosit mononuklear yang dapat diaktivasi dengan lipopolisakarida (LPS), sumber yang lain adalah sel T yang dirangsang oleh sel NK aktif dan sel mast aktif. TNF adalah mediator dalam imunitas spesifik, dan juga mediator dalam menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut.

Pada proses aktivasi sel T, TNF- α berfungsi untuk meningkatkan ekspresi reseptor terhadap IL-2 dan IFN- γ dari sel T. Selain itu TNF- α juga diekskresi bila dalam tubuh terdapat endotoksin dan terjadi trauma fisik, selain itu juga mempunyai efek sitotoksik langsung terhadap sel tumor.

Penelitian mengenai TNF α dan IL-1 pada tikus dewasa dapat meningkatkan hormon testosteron. Sitokin ini diduga mempunyai efek pada makrofag intra testiskular dan pada sel Leydig (Dwight et al, 1990).

Pada percobaan in vitro telah dibuktikan bahwa media kultur makrofag intra testiskular mempengaruhi hormon testosteron apabila ditambahkan pada sel Leydig, belum jelas faktor apa yang bertanggung jawab. Studi serial menunjukkan TNF α mampu mempengaruhi sel Leydig (Hutson, 1993).

Pengujian terhadap TNF dimaksudkan untuk menguji fungsi dari sel-sel monosit sirkulasi atau makrofag jaringan. Pengujian dilakukan berdasarkan kemampuan TNF untuk menghambat/mematikan pertumbuhan *cell line* yang peka terhadap TNF, seperti : L-929 *fibroblast cell line*, *Murine Fibrosarcoma cell line (WEHI-160 JD)*. Pengamatan hasil dapat dilakukan dengan cara penambahan radioisotop atau dengan cara pengecatan terhadap kultur sel yang masih hidup. Pengujian dapat juga dilakukan dengan cara *radioimmunoassay* (RIA) dan ELISA.



III. 4 Imunomodulator

Imunomodulator adalah obat-obatan yang secara langsung memodifikasi fungsi imun, mempunyai efek positif; mampu meningkatkan fungsi dan aktivitas komponen sistem imun atau efek negatif; mampu menekan fungsi dan aktivitas komponen sistem imun (Ma'at, 1997).

Mekanisme imunomodulasi ditujukan terhadap hampir semua sel-sel imunokompeten, tetapi kenyataannya lebih banyak ditujukan terhadap respon imun non-spesifik sementara ini . Walaupun demikian usaha untuk mendapatkan imunomodulator yang spesifik (*Antigen specific immunomodulation*) sudah banyak mendapatkan hasil dan sudah digunakan di klinik.

Imunomodulator dibagi menjadi dua yaitu: **Imunostimulator**, adalah bahan-bahan yang dapat meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun, dan **Imunosupresor** adalah bahan-bahan yang dapat menekan fungsi dan aktivitas sistem imun baik terhadap sistem imun normal atau sistem imun yang terganggu. Kegunaannya di klinik terutama pada transplantasi alat tubuh dalam usaha mencegah reaksi penolakan dan pada penyakit autoimun untuk menghambat pembentukan antibodi (Baratawidjaja, 1991).

III. 5 Testis menciit

Testis merupakan kelenjar tubuler yang sangat kompleks dan mempunyai dua fungsi yaitu fungsi eksokrin dan fungsi endokrin. Fungsi eksokrin yaitu spermatogenesis yang terjadi di tubulus seminiferus untuk memproduksi spermatozoa, sedangkan fungsi endokrin yaitu proses steroidogenesis yang terjadi pada sel Leydig memproduksi hormon testosteron dan derivatnya (Ferdinandus, 1980).

Bagian posterior testis terdapat penebalan tunika albugenia yang berjalan memasuki testis, dan disebut dengan mediastinum testis. Mediastinum testis membagi bagian dalam testis menjadi kurang lebih 250 lobuli, dan tiap lobuli terdapat 1-4 tubuli seminiferus. Sel yang utama dalam tubuli seminiferus adalah sel Leydig, sel ini mempunyai ukuran besar, berkelompok dan mampu mensekresi hormon steroid terutama testosteron atas rangsangan hormon *Luteinizing Hormon* (LH) yang diproduksi oleh hipofise anterior.



BAB IV

MATERI DAN METODA

IV.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilakukan dalam waktu sekitar 5 bulan, mulai Juli 2003 sampai dengan November 2003.

IV.2 Langkah – langkah Penelitian

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan, yang meliputi perlakuan pada hewan coba selama 35 hari, isolasi protein intratestikular, SDS PAGE dan *Imunoblotting* dengan menggunakan *Western Blott*, diikuti dengan *dot Blott*.

IV.3 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik, yaitu untuk mendeskripsikan tentang protein spesifik TNF - α intratestikular. Penelitian ini dimaksudkan untuk menjawab pertanyaan bagaimana profil protein TNF - α intratestikular setelah pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L*, oleh karena itu penelitian ini termasuk penelitian deskriptif.

IV.4 Materi Penelitian

IV.4. a Unit Analisis

Unit analisis penelitian ini adalah testis mencit jantan (*Mus musculus*) setelah pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L*.

IV.4. b. Bahan dan Alat Penelitian

Jenis bahan dan alat yang diperlukan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Elektroforesis dengan SDS – PAGE 12 %

Meliputi peralatan utama elektroforesis lengkap dengan pengatur voltase, mikropipet, pipet tip, *shacker*, dan peralatan gelas lainnya. Bahan kimia yang diperlukan antara lain: Acrilamid, Tris HCl pH 8,8, Tris Hcl pH 6,8, SDS 0,5 %, aquades, temed, APS 10 % 4° C, E buffer, methanol 50 %, methanol 5 %, asam asetat 7,5 %, glutaral dehide 10 %, NaOH 0,36 5, NH₃, AgNO₃, zitronensoure 5 %, butanol.

2. Immunoblotting (Western Blott)

Peralatan yang diperlukan adalah *transblott apparatus*, mikropipet, pipet tip, petri dish, *water bath*, dan alat-alat gelas lainnya. Bahan kimia yang dipelukan antara lain: Tris buffer salina, *Bovine Serum Albumine* (BSA) 1 %, BSA 0,5 %, BSA 0,05 %, *Western blotting substrat solution*, Aquades, antibodi (Anti-mouse TNF α *Polyclonal*) dari PIERCE ENDOGEN *Ordering Code* : P-350, *Lot Number* : DI58585

IV.5 Metode Penelitian

IV.5.1 Perlakuan pada hewan coba

Sampel penelitian menggunakan mencit dewasa berumur \pm 2 bulan dengan berat badan antara 20-25 gram, dengan alasan secara seksual mencit telah dewasa (*Sexually mature*) dan perubahan berat badan selama proses penelitian relatif kecil (Hume, 1972).

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan, karena akan diteliti pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L terhadap gambaran protein TNF- α intratestikular. Dipilih mencit jantan yang sehat.

Hewan coba dalam hal ini mencit jantan (*Mus musculus*) diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara per-oral dengan sonde lambung, dengan dosis 4 mg/0,1 ml dan 8 mg/0,1 ml, serta 0,1 ml aquadest yang merupakan pelarut dari ekstrak *Phyllanthus niruri* L sebagai plasebo. Perlakuan ini diberikan selama 35 hari, dengan interval pemberian sekali sehari.

IV.5.2 Perlakuan pada testis

Setelah 35 hari mencit dikorbankan dengan cara ligasi leher, kemudian kedua testisnya diambil dan ditimbang. Untuk pemeriksaan hanya digunakan testis kiri. Testis yang sudah diambil kemudian dibersihkan dari jaringan yang melekat, kemudian dicuci dengan menggunakan PBS steril sebanyak 5 kali. Setelah itu potong-potong testis dengan gunting dan gerus testis dengan menggunakan spatula yang terbuat dari gelas dan masukkan kedalam tabung *eppendrof*, kemudian tambahkan PBS 100 μ l kemudian aduk dan gerus lagi sampai betul-betul homogen. Sentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Ambil supernatan secara pelan-pelan dengan mikropipet kemudian masukkan ke dalam tabung *eppendrof* baru dan siap untuk di elektroforesis.

IV.5.3 Elektroforesis Protein dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polycrilamide Gels Electrophoresis*)

Karakterisasi Protein, dilakukan dengan elektroforesis, berikut :

a. Mencetak *Running Gel* 12 %

Langkah pertama dari proses ini adalah mencampurkan bahan-bahan untuk penyusunan *running gel* 12 % sampai homogen (komposisi bahan seperti dijelaskan pada lampiran 7). Kemudian secara cepat dan larutan terus digoyang, masukkan campuran bahan

tersebut kedalam *glass plate* yang telah bersekat dan lakukan fiksasi sedemikian rupa sehingga hasil *running gel* menjadi rata. Untuk meratakan bagian atas *running gel*, tambahkan butanol di atasnya, kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar agar *running gel* menjadi padat. Setelah 30 menit, buang butanol dan kemudian cuci *running gel* dengan *electrophoresis buffer* yang sudah diencerkan 10 kali, kemudian bersihkan dan keringkan *running gel* dengan kertas filter.

b. Mencetak *Stacking Gel* 12 %

Campur bahan untuk membuat *stacking gel* 12 % sampai homogen, kemudian tuang ke dalam cetakan yang telah tercetak dengan *running gel*, kemudian masukkan *comb* dan inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar sampai *stacking gel* padat. Setelah *stacking gel* padat, lepas *comb* kemudian bersihkan dan cuci *stacking gel*.

c. Menyiapkan Sampel

Campur sebanyak 10 μ l sample kedalam *Laemmli buffer* dengan perbandingan 1 : 2 ke dalam tabung *ependrof* yang tutupnya sudah dilubangi dengan jarum. Kemudian lakukan denaturasi protein dengan memanaskan campuran tersebut pada suhu 100°C selama 5 menit.

d. Elektroforesis

Pasang *glass plate* yang berisi *running gel* dan *stacking gel* kedalam bak elektroforesis (sebelumnya sekat dilepas) dan fiksasi *glass plate* dengan baik. Selanjutnya masukkan sampel ke dalam cetakan *stacking gel* melalui sekat-sekat *comb*. Kemudian *turn on* elektroforesis dengan voltase 125 V dan kuat arus sebesar 40 mA, perlu diperhatikan jangan sampai timbul gelembung udara saat memasukkan sampel. Untuk menghentikan proses elektroforesis harus menunggu semua sampel turun melewati *running gel*.

IV.5.4 Immunoblotting (*Western Blott*)

Imunoblotting yang digunakan pada penelitian ini adalah *western blott*, karena yang ditransfer pada metode ini adalah protein. Protein blotting merupakan suatu metode yang umum digunakan untuk mentransfer protein dari poliakrilamid gel elektroforesis (SDS PAGE) ke membran nitroselulose. *Western blott* biasanya digunakan untuk menentukan kadar relatif dari suatu protein dalam suatu campuran berbagai jenis protein atau molekul lain (Kresno, 2001)

Efektivitas tergantung dari gelnya sendiri (tebal, macam), jenis protein, lama transfer, dan macam transfer, tanpa mempengaruhi/mengurangi reaktivitas dari protein. Dengan proses ini memberikan kemungkinan untuk mendeteksi secara radiografi atau enzimatis/imunologi (Artama, 1991).

Pada proses *imunoblotting*, biasanya membran nitroselulose yang masih reaktif terlebih dahulu diblock untuk menghindari reaksi yang tidak spesifik atau menekan *background*, supaya mendapatkan hasil transfer yang kontras dan band yang tajam. Untuk mentransfer protein secara kuantitatif, dimana semua protein dari elektroforesis bias ditransfer ke membran nitroselulose. Membran nitroselulose merupakan membran yang paling sering digunakan, mudah disimpan, karena tidak memerlukan cara khusus dan relatif murah. Protein yang diikat oleh membran nitroselulose dapat mempertahankan antigenitasnya dan dengan mudah direaksikan dengan antibodi.

Posisi antigen yang dicari dapat diidentifikasi pada membran dengan mereksikannya dengan antibodi dalam hal ini dipakai Anti-Mouse TNF α *Polyclonal* yang bertanda atau dilabel dengan radioisotop. Antibodi yang telah dilabel tersebut akan

menghasilkan bercak *chemiluminasen* dan menunjukkan posisi kompleks antigen – antibodi yang dicari, merupakan ukuran untuk berat molekul dan kadar antigen.

Prosedur kerja:

Gel hasil elektroforesis dengan SDS – PAGE, kemudian dilakukan *immunoblotting* menggunakan metode *Western Blott*, menggunakan antibodi (Anti-Mouse TNF α *Polyclonal*) dari PIERCE ENDOGEN *Ordering Code* : P-350, *Lot Number* : DI58585

- *Semi dry elektroforesis*

Hasil dari SDS – PAGE tanpa dilakukan pencucian dan pewarnaan ditransfer ke membran nitroselulose. Untuk mentransfer, tahap pertama yang harus dilakukan adalah menyiapkan kertas filter dan membran nitroselulose yang telah dipotong sesuai dengan besarnya gel hasil elektroforesis, kemudian merendamnya kedalam transfer buffer sebanyak 2 kali, masing-masing selama 15 menit. Tahap selanjutnya adalah menyiapkan kertas filter dalam alat *blotting* sebanyak 3 lapis, kemudian diatas kertas filter diberikan 1 lapis membran nitroselulose, kemudian gel hasil elektroforesis, dan terakhir diberikan lagi 3 lapis kertas filter, kemudian dibasahi lagi dengan *transfer buffer*, sehingga terbentuk lapisan seperti *sandwich*. Kemudian lapisan tersebut tapiskan pada *running buffer*. Siapkan sumber listrik dengan voltase sebesar 15 V dan kuat arus sebesar 0,35 A selama kurang lebih 60 menit.

- *Immunoblotting*

Pertama, ambil membran nitroselulose yang telah dilakukan transfer protein secara perlahan-lahan dan hati-hati. Selanjutnya membran *blocking* dengan cara dimasukkan ke dalam larutan PBS yang ditambah dengan BSA 1% selama semalam pada suhu 4°C dan dilanjutkan pencucian dengan menggunakan 0,5 % tween 100 dalam TBS selama 10 menit, pencucian diulang sebanyak 5 kali dan dilakukan di atas *shacker*. Membran selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan antibodi dalam PBS (1 : 50) dan diinkubasikan 1 jam pada

temperatur ruang dengan *shacker*, kemudian dilakukan pencucian kembali dengan menggunakan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit, pencucian diulang 5 kali dengan cara yang sama.

Selanjutnya membran diinkubasikan dalam larutan konjugat *Ig G goat anti rabbit* 1:3000 (Santa Cruz, USA) selama 1 jam pada temperatur kamar dengan *shacker* dan kemudian diikuti dengan pencucian sebanyak 5 kali dengan 0,05 % Tween 100 dalam TBS dengan cara yang sama. Membran diwarnai dengan menggunakan substrat *Western Blue Ready* dan reaksi dihentikan apabila sudah terlihat pita protein dengan cara menambahkan aquades. Perhitungan berat molekul yang spesifik dilakukan dengan membandingkan antara pita protein yang tampak dengan marker standart (Rybicki and purves, 1996).

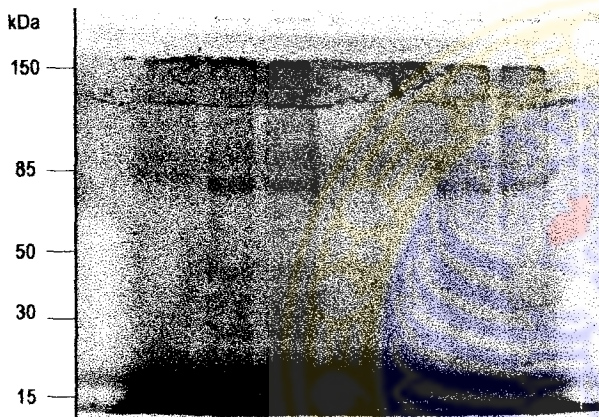
- **Dot Blot**

Sampel diteteskan langsung pada membran nitroselulose dengan mikropipet maksimal 5 µl dan biarkan mengering pada suhu ruang. *Blocking* membran nitroselulose dengan 1% BSA dalam TBS Tween 0,5%. Inkubasi pada suhu kamar 2 jam, suhu ruang atau semalam pada 4°C. Cuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05 % 5 x 10 menit dengan *shacker*. Tambahkan antibodi primer dalam buffer inkubasi, selanjutnya inkubasikan pada suhu ruang dengan *shacker* selama 1 jam. Cuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05% 5 x 10 menit dengan *shacker*. Tambahkan antibodi sekunder (*Ig G goat anti rabbit conjugate*). Inkubasi pada suhu ruang dengan *shacker* selama 1 jam. Cuci membran nitroselulose dengan TBS Tween 0,05 % 5 x 10 menit dengan *shacker*. Tambahkan substrat dan inkubasi suhu kamar di ruang gelap dengan digoyang sampai terlihat warna (hasil).Hentikan reaksi dengan memindahkan membran nitroselulose dalam *aquabidest deionized*. Membran nitroselulose dikeringkan pada suhu ruang dan hasil siap dianalisis.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis *whole extract* (protein somatik) testis mencit dengan SDS-PAGE didapatkan 6 (enam) fraksi protein yaitu 87 kDa, 80 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, dan 26 kDa, selengkapnya disajikan pada gambar 5.1.



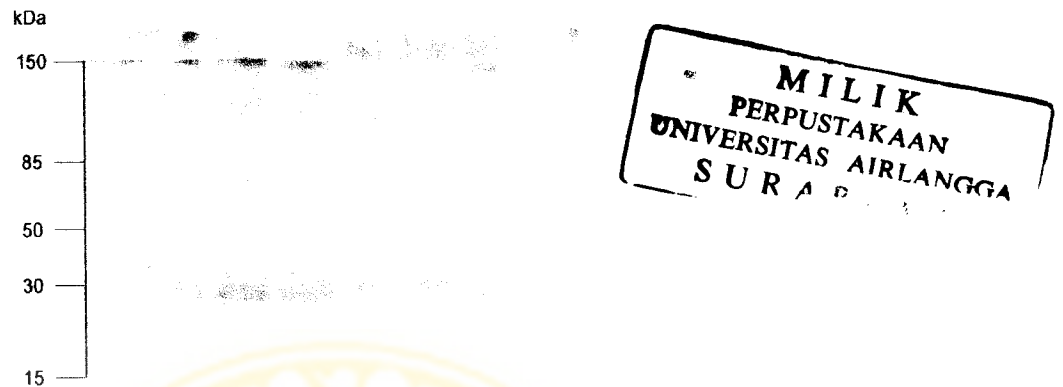
Gambar 5.1. Hasil elektroforesis *whole extract* (protein somatik) testis mencit.

Keterangan :

- M : Marker
- 1 : Plasebo
- 2 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml tanpa sonikasi,
- 3 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml tanpa sonikasi
- 4 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml dengan sonikasi
- 5 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml dengan sonikasi
- 6 : Sumur kolom Perlakuan 8 mg/0.1 ml tanpa sonikasi
- 7 : Sumur kolom Perlakuan 8 mg/0.1 ml tanpa sonikasi

Gambar 5.1. terlihat satu *band* protein yang lebih tebal yaitu protein dengan berat molekul 26 kDa dibandingkan dengan *band* protein yang lain. Protein tersebut diduga merupakan $TNF \alpha$.

Hasil *immunoblotting whole extract* (protein somatik) testis mencit menggunakan antibodi (Anti-mouse TNF α Polyclonal), selengkapnya disajikan pada gambar 5.2



Gambar 5. 2. Hasil *Immunoblotting whole extract* (protein somatik) testis mencit.

Keterangan :

- M : Marker
- 1 : Plasebo
- 2 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml tanpa sonikasi,
- 3 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml tanpa sonikasi
- 4 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml dengan sonikasi
- 5 : Sumur kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml dengan sonikasi
- 6 : Sumur kolom Perlakuan 8 mg/0.1 ml tanpa sonikasi
- 7 : Sumur kolom Perlakuan 8 mg/0.1 ml tanpa sonikasi

Profil protein intratestikular menggunakan SDS PAGE 12 % dan teknik immunoblotting

Penelitian ini melakukan preparasi protein struktural dengan menggunakan SDS PAGE; menentukan perbedaan letak *band* pada gel dibandingkan dengan marker protein. Untuk mendapatkan berat molekul yang tepat, maka diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara 150 – 15 kDa.

Pada gambar 5.1 dan gambar 5.2, tampak adanya 8 kolom, yaitu satu kolom marker, satu kolom kontrol, dua kolom Perlakuan 4 mg / 0.1 ml *Phyllanthus niruri L* tanpa sonikasi, dua kolom Perlakuan 4 mg/0.1 ml *Phyllanthus niruri L* dengan sonikasi, dan dua kolom Perlakuan 8 mg/0.1 ml *Phyllanthus niruri L* tanpa sonikasi. Apabila dibandingkan, kedelapan kolom tersebut hampir memiliki *band* protein yang sama banyaknya, yaitu antara 6 – 7 *band* protein. Pada sumuran kolom 4 dan 5 yang menggunakan desintegrasi protein dengan cara sonikasi, tidak akan dibahas pada bab ini karena pada waktu pemeriksaan terjadi kerusakan molekul protein pada teknik tersebut.

Beberapa *band* protein pada kedelapan kolom tersebut, setelah dilakukan perhitungan dengan mencari Rf (*retardation factor*), kemudian dicari persamaan serta dibuatkan kurva standart (lampiran 1), ternyata menghasilkan berat molekul yang hampir sama.

Hasil fraksinasi protein didapatkan beberapa *band* yang tercetak tebal seperti pada fraksi protein 87 kDa, 80 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, dan 26 kDa, untuk sumuran kolom pada perlakuan 4 mg/0.1 ml *Phyllanthus niruri L*, sedangkan untuk sumuran kolom pada Perlakuan 8 mg/0.1 ml *Phyllanthus niruri L* didapatkan fraksi protein 87 kDa, 80 kDa, 38 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 32 kDa, dan 26 kDa. Muncul lagi satu fraksi protein diduga berkaitan dengan dosis pemberian *Phyllanthus niruri L*.

Pada suatu penelitian untuk mencari agen pembunuh sel tumor, ditemukanlah *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang diidentifikasi dari derivat faktor makrofag yang mampu menjadikan nekrosis sel tumor pada mencit (Carswell, et al, 1975).

Pada beberapa fraksi protein di atas, protein dengan berat molekul 26 kDa dimaksud merupakan protein spesifik dari TNF - α sesuai dengan laporan (Anonimus, 2002); *Tumor necrosis factor* α di ekspresikan dengan berat molekul 26 kDa pada protein membran yang

dapat dipisahkan oleh TNF - α *converting enzyme* (TACE), TNF - α mempunyai aktivitas sebagai anti tumor, modulasi sistem imun, keadaan inflamasi, anoreksia, septic shock, replikasi virus dan hematoposis.

Makrofag yang aktif mensekresi *Tumor Necrosis Factor* (TNF) suatu agen yang dapat membunuh sel tumor dan tidak membunuh sel normal. Mekanisme lisis sel tumor oleh TNF adalah: pertama, TNF berikatan dengan reseptor permukaan sel tumor yang berafinitas tinggi (*high-affinity cell surface receptors*), mengakibatkan sel tumor memproduksi radikal bebas yang toksik terhadap sel tumor itu sendiri. Bagi sel normal, TNF merangsang sintesis dismutase superoksida (*superoxide dismutase*) yang dapat menginaktifkan radikal bebas. Kedua, TNF secara langsung dapat menyebabkan sel tumor nekrosis, walaupun tidak memiliki reseptor.

Sel makrofag/monosit merupakan sumber yang utama TNF secara *in vivo*, tetapi ada beberapa sel yang mampu menghasilkan aktivitas biologi dari TNF (misal ; sel NK, sel Kuffer, sel Mast) . Sirkulasi monosit, makrofag ditemukan pada organ yang memberikan kontribusi TNF dalam jumlah yang signifikan selama aktivasi pada respon imun.

Selama aktivasi dan induksi sekresi pada TNF protein membran akan dibelah oleh Serine Protease (TACE = TNF α *converting enzyme*) dari prekursor 26 kDa menjadi monomer dengan berat molekul 17 kDa yang tersusun dari 157 asam amino.

TNF *protease inhibitor* bisa menghambat pematangan dan sekresi TNF oleh makrofag, ini menunjukkan bahwa jalur sekresi pada target membran merupakan jalur utama untuk regulasi pelepasan TNF (Mc Geehan et al, 1994).

Bentuk protein membran (26 kDa) dari TNF mempunyai aktivitas biologi, sebab sitotoksitas pada sel tumor diperantarai dengan kontak langsung antara sel-sel itu dengan makrofag terutama pada membran, fenomena ini dapat dihambat dengan antibodi anti TNF (Kriegler et al, 1998 and Perez et al, 1990).

TNF adalah suatu mediator untuk imunitas alami atau natural dan imunitas spesifik atau *acquired*. Disamping itu juga merupakan mediator yang penting guna menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut.

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian imunologik dari tanaman obat *Phyllanthus niruri* L terhadap hewan percobaan mencit untuk membuktikan apakah tanaman tersebut dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi sistem imun, spesifik atau non-spesifik maupun sistem imun humoral atau seluler sehingga dapat dikatakan sebagai *imunostimulator*.

Suatu imunomodulator atau tepatnya suatu imunostimulator bukan merupakan imunogen atau antigen, akan tetapi suatu bahan yang mampu memodulasi komponen sistem imun tanpa bereaksi atau berikatan secara imunologis dan umumnya bekerja melalui reseptor karbohidrat yang ada dipermukaan masing-masing sel imunokompeten (Ma'at, 2001).

Pada hasil penelitian ini terjadi reaksi berupa perubahan warna yang menunjukkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi. Tizzard (1982) mengatakan faktor-faktor yang mempengaruhi daya antigenitas suatu bahan adalah keasingan, ukuran molekul, kerumitan struktur kimia dan konstitusi genetik

Anti TNF α (antibodi poliklonal) digunakan oleh karena antibodi ini mempunyai afinitas yang tinggi , tetapi antibodi yang non spesifik dapat berikatan dengan antigen yang tidak spesifik, oleh karena itu perlu dilakukan purifikasi terlebih dahulu, sedangkan antibodi

monoklonal sangat spesifik terhadap antigen, tetapi afinitasnya rendah, untuk mendapatkan titer antibodi yang tinggi perlu dilakukan *kloning* sebelum digunakan (Rantam, 2003).

Dari hasil penelitian ini, didapatkan reaksi yang positif jika direaksikan dengan anti TNF - α , pada kelompok kontrol (plasebo), Perlakuan 4 mg/0.1 ml *Phyllanthus niruri L*, dan Perlakuan 8 mg/0.1 ml *Phyllanthus niruri L*. ditunjukkan dengan timbulnya pita (*band*) yang terwarnai, dengan berat molekul sebesar 26 kDa.

Dosis pemakaian dalam pengujian harus ditentukan secermat mungkin karena dosis obat sebagai imunomodulator tidak mengikuti kaidah takaran obat pada umumnya; artinya apabila dosis diperbesar, belum tentu efek terhadap sistem imun menjadi lebih besar, bahkan kemungkinan terjadi efek sebaliknya, hal ini terutama berlaku bagi bahan dari tanaman obat yang bersifat imunostimulator; apabila dosis ditingkatkan, malah menjadi immunosupresor. Wagner, (1991): *immunostimulating agents do not follow the normal dose-activity rule*.

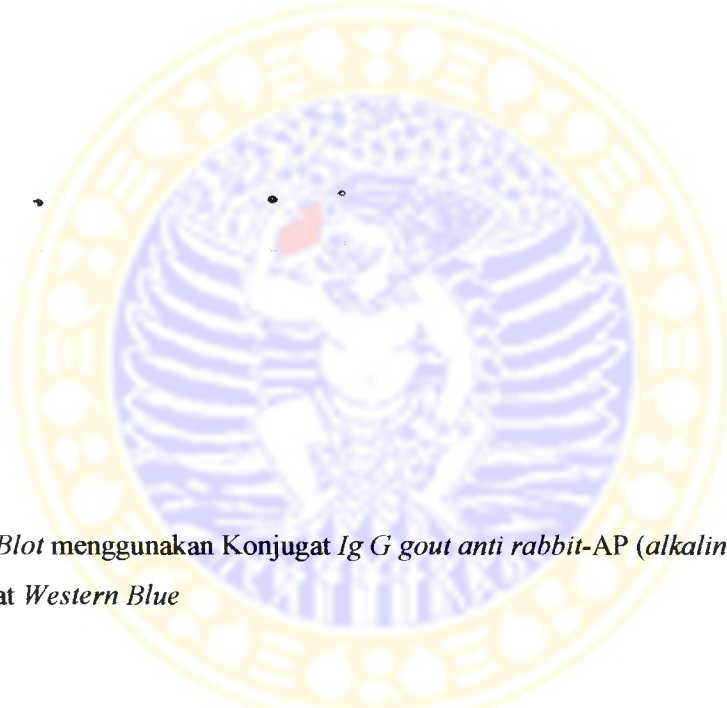
Hasil penelitian diperoleh kadar TNF α yang digambarkan adanya *band* sehingga disimpulkan bahwa *Phyllanthus niruri L* berdampak pada fungsi sistem reproduksi sebagai obat yang dipakai untuk pengobatan pada gangguan spermatogenesis (antisterilitas).

Setelah uji praklinis, obat alami dapat ditingkatkan menjadi bentuk sediaan fitofarmaka dengan melakukan uji klinis. Upaya klarifikasi khasiat dan keamanan obat alami perlu terus didorong melalui pelaksanaan uji praklinis yang sistematis dan terukur, sehingga dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah.

V.2 Profil protein TNF - α dengan menggunakan teknik *dot blot*

Metode *dot blot* dikembangkan untuk semikuantitatif pada uji imun untuk mendeteksi antigen. Sampel yang mengandung antigen diteteskan pada membran yang dilabel dengan antibodi (*Anti mouse TNF α Polyclonal*). *Dot blot* hanya digunakan untuk mengetahui jenis antigen bukan berat molekul protein. Namun demikian estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada *blotts* tersebut, Metode ini cukup baik untuk digunakan uji atau skrining dengan sampel yang cukup banyak. (Rantam, 2003).

Hasil *Dot Blotts* disajikan pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Hasil *Dot Blot* menggunakan Konjugat *Ig G goat anti rabbit-AP (alkaline phosphatase)* dan substrat *Western Blue*

Gradasi warna yang timbul merupakan variasi konsentrasi antibodi yang dideteksi, semakin tinggi konsentrasi antibodi, semakin gelap warna, dengan cara menurunkan taraf kegelapan (*opacity*) masing-masing baris mulai 100%, 60%, 30% kemudian 10%, pada gambar 5.3.

Tebal tipisnya *dot blot* protein merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penyandi protein tersebut. Semakin tebal *dot blot* protein yang terlihat, semakin banyak

ekspresi protein sel penyandi. Pada penggunaan 4 mg/0,1 ml *Phyllanthus niruri L* masih relatif tebal secara semikuantitatif dibandingkan dengan penggunaan 8 mg/0,1 ml *Phyllanthus niruri L*, diduga pada 8 mg/0,1 ml *Phyllanthus niruri L* (dua kali dosis lazim), efek terhadap sistem imun menjadi semakin kecil, sesuai kaidah yang disampaikan Wagner (1991); *immunostimulating agents do not follow the normal dose-activity rule*



BAB VI KESIMPULAN DAN SARA

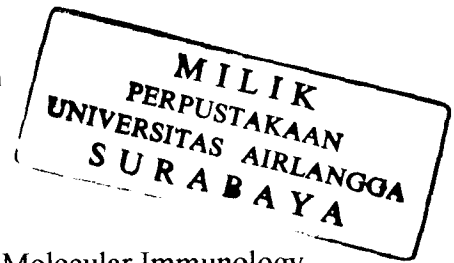
VI.1 Kesimpulan

1. Fraksi protein intra testikular diperoleh masing-masing dengan berat molekul berikut ; 87 kDa, 80 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, dan 26 kDa. Fraksi dengan berat molekul 26 kDa merupakan fraksi dari TNF α .
2. *Phyllanthus niruri L* mampu meningkatkan sekresi TNF α intra testikular yang merupakan komponen sistem imun sehingga bersifat imunostimulan.

VI.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut terhadap masing-masing fraksi protein yang diperoleh guna mengetahui imunokompeten intra testikular yang dirangsang sekresinya oleh *Phyllanthus niruri L*
2. Perlu diteliti tentang mekanisme aktivitas imunostimulan *Phyllanthus niruri L*, dengan melakukan pengujian klinis.
3. Eksplorasi lebih lanjut terhadap tanaman obat asli Indonesia genus lain yang berkaitan dengan aspek imunologi.

DAFTAR PUSTAKA



- Abbas A.K., Lichtman A.H., Paber J.S. 1994. *Cellular and Molecular Immunology*, Philadelphia WB Saunders Company, 237-294.
- Anonimus, 2002. *Biochemicals and Reagents for Life Science Research*. Sigma. Singapore. 2055-2059.
- Artama, W.T. 1991. *Rekayasa Genetika*. PAU –Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Jogjakarta; 1-35.
- Baratawidjaja, K.G. 2000. *Imunologi Dasar*. Edisi Keempat. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta; 22-37, 151-158.
- Benahmed M , 1997. Role of Tumor Necrosis Factor in The male Gonad Contracept Fertil Sex 25 : 569-571.
- Bharatiya VB. 1992. *Selected Medicinal Plants of India*. Bombay: Tata Press, 235-237.
- Carswell Ea, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, William son B 1975. An endotoxin-induced Serum Factor that Causes Necrosis of Tumors. *Proc Nati Acad Sci USA*; 72: 3666-3670.
- Chirigos M. A 1992. *Immunomodulator: Current and Future Development and Application* Thymus 1992, 19 Suppl. 1 : 57.
- Dwight w. Warren, Vijaya P, Yin Lu, Barbara W. Platler and Richard Horton. 1990. *Journal of Andrology*; 353-359.
- Ferdinandus I A, 1980. *Spermatogenesis ditinjau dari Segi Histologi: Prosiding Seminar Spermatogenesis (editor KM. Arsyad) Surabaya, Desember : 1-16.*
- Huleihel M, Linenfeld E, Levy A, Potashnik G and Glazerman M, 1996. *Distinct Expression Levels of Cytokines and Soluble Cytokine Receptors in Seminal Plasma of Fertile and Infertile Man “ Fertility and Sterility”* 66 : 135-139.
- Hume VW, 1972. *The UFAW Handbook On The Care and Management Of Laboratory Animal*. 4th Edition. Churchill, Livingstone, Edinburg and London. pp 192-204.
- Huston J.C. 1993. *Secretion of TNF α by Testicular macrophage* J. *Reprod. Immunology* 23 : 63-72.
- Jaffe S B and Jewelewicz R. 1991. *The Basic Infertility Investigation*. *Fertil Steril* 56; 4 :599-615.

- Jaffe S.H., Sherwin S.A. 1991 Immunomodulator in (Stites DP, Terr I A) : Basic and Clinical Immunology. Seventh Edition. A Learge Medical Book, Prentice-Hall International Inc: 780-786.
- Joshi B. 1986. Isolation and Structure (X-ray Analysis) of entt-Norseccurin, an alkaloid from *Phyllanthus niruri L.* Journal of Natural Product . vol.9 No. 4. J.Aug 1986:614-620.
- Kresno, S.B. 2001. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta; 56-57, 73-76, 182-184.
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramification for the complex physiology of TNF. Cell; 53 : 45-53
- Ma'at S, 2001. STIMUNO (Ekstrak *Phyllanthus niruri L*) sebagai Terapi Imun dan Terapi Adjuvant untuk Penyakit-penyakit Infeksi. Kongres Nasional – IV Perhimpunan Alergi-Imunologi Indonesia. Medan, 31 Maret 2001.
- Ma'at S, 1998. Imunomodulator yang Berasal dari Tanaman Obat (Pengaruh Obat Tradisional pada Sistem Kekebalan Tubuh). Seminar Sehari Pemanfaatan Obat Asli Indonesia. Surabaya, 24 Nopember 1998.
- Ma'at S, 1997. *Phyllanthus niruri L* sebagai Imunostimulator pada mencit. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Mc Geehan GM, Becherer JD, Bast Jr RC, et al. 1994. Regulation of tumor necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. Nature; 370 :558-561.
- Meixa W, Haowei C, Yanjin L, et al. 1995. Herbs of *Phyllanthus* in The Treatment of Chronic Hepatitis B : Observation with Three Preparations from different Geographic Sites. J Lab Clin Med. : 126: 350-352
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. Cell; 63: 251-258.
- Rantam F A, 2003. Metode Imunologi.Cet. I. Airlangga University Press.
- Rybicki and M. Purves. 1996. SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Departement Microbiology. University of Cape Town.
- Sigal S.H., Ron Y. 1994. Immunology and Inflammation, basic Mechanisms and Clinical Consequences Mc. Graw Hill, Inc. Healt Profession Division : 153-225.

- Singh B, Agrawal P K, Thakur R S, 1989. A new Lignan and neolignan from *Phyllanthus niruri L*. Journal of Natural Product. Vol. 52. No. 1, Jan.-Feb. 1989: 43-45.
- Subarnas A dan Sidik, 1993. *Phyllanthus niruri L*, Kimia, Farmakologi dan Penggunaannya dalam Obat Tradisional: Dalam Seminar Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia V. Surabaya, 13-14 Agustus 1993.
- Sugiarso, N.C. 2002. Pengembangan Obat Tradisional lewat Pendekatan Etnofarmakologis, Jurnal Obat Bahan Alam Vol. 1 No.1 Mei-Nopember 2002.
- Suresh K. Vasudevan DM. 1994. Augmentation of Murine Natural Killer Cells and Antibody dependent Cellular Cytotoxicities by *Phyllanthus emblica*, a new immunomodulator. J. Ethnopharmacol Aug; 44(1): 55-60.
- Sutarjadi, Djatmiko W, Soedjoko B, Santoso M H, 1990. Penelitian Aktifitas Biologi Tanaman Obat Indonesia melalui Pendekatan Immunologis. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga : 1-4.
- Tizzard, I.R. 1982. An Introduction to veterinary immunology. 2nd, Canada
- Thyagarajan SP, Subramanian S, Thirunalasundar T, et al. 1988. Effect of *Phyllanthus amarus* on Chronic carries of hepatitis B virus. Lancet : ii: 764-766.
- Xiong Y and Hales DB. 1993. The Role of Tumor necrosis Factor- Alpha in The Regulation of Mouse Leydig Cell Steroidogenesis. Endocrinology 132 2438-2444.
- Wagner H, Jurecic K, 1991. Assay for Immunomodulation and effect on Mediators of Inflammation. In (Dey PM, Harbone JB) Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6: Assays for Bioactivity. Academic Press, London : 195-217.
- Wydiawarutanti A, 1993. Standarisasi Herba Meniran (*Phyllanthus niruri L*) Menurut Metode Materia Medika Indonesia : Dalam Seminar Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia V. Surabaya, 13-14 Agustus 1993.
- Zhang L.H., Huang Y., Wong L.W., Xiao P.G. 1995 Several Compounds From Chinese Traditional and Herbal Medicine as Immunomodulators Phytotherapy research Vol. 9 1995 : 315-322.

Lampiran 1.**Penentuan Berat Molekul**

Hitung nilai *Rf* pada masing-masing *band*.

Rf (Retardation factor) = $\frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$

Nilai *Rf* marker

Marker (kDa)	<i>Rf</i>
150	0.13
85	0.37
50	0.55
30	0.71
15	0.95

Perhitungan :

Panjang gel sesudah dirunning = 6,2 cm

1. $Rf = 0,8 / 6,2 = 0,13 \rightarrow$ Protein 150 kDa,
2. $Rf = 2,3 / 6,2 = 0,37 \rightarrow$ Protein 85 kDa,
3. $Rf = 3,4 / 6,2 = 0,55 \rightarrow$ Protein 50 kDa,
4. $Rf = 4,4 / 6,2 = 0,71 \rightarrow$ Protein 30 kDa,
5. $Rf = 5,9 / 6,2 = 0,95 \rightarrow$ Protein 15 kDa,

Data yang didapatkan pada marker, dimasukkan persamaan linier dimana koefisien X = *Rf* marker, dan koefisien Y = Protein marker (kDa), maka diperoleh persamaan berikut : $Y = 2,3596 - 1,2327 X$

Lampiran 2.**Penentuan Berat Molekul Sumuran kolom 2-3**

Didapatkan nilai *Rf* sebagai berikut :

1. $Rf = 2,1 / 6,2 = 0,34$
2. $Rf = 2,3 / 6,2 = 0,37$
3. $Rf = 4,0 / 6,2 = 0,65$
4. $Rf = 4,2 / 6,2 = 0,68$
5. $Rf = 4,45 / 6,2 = 0,72$
6. $Rf = 4,8 / 6,2 = 0,77$

Dengan persamaan linier di atas dan dicari nilai *anti logaritme*, maka diperoleh protein dengan berat molekul sebagai berikut ;

1. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,34) = 1,9405$, *anti log* 1,9405 = 87,19, dibulatkan 87 kDa
2. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,37) = 1,9035$, *anti log* 1,9035 = 80,08, dibulatkan 80 kDa
3. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,65) = 1,5583$, *anti log* 1,5583 = 36,17, dibulatkan 36 kDa
4. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,68) = 1,5214$, *anti log* 1,5214 = 33,22, dibulatkan 33 kDa
5. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,72) = 1,4721$, *anti log* 1,4721 = 29,66, dibulatkan 30 kDa
6. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,77) = 1,4104$, *antilog* 1,4104 = 25,73, dibulatkan 26 kDa.

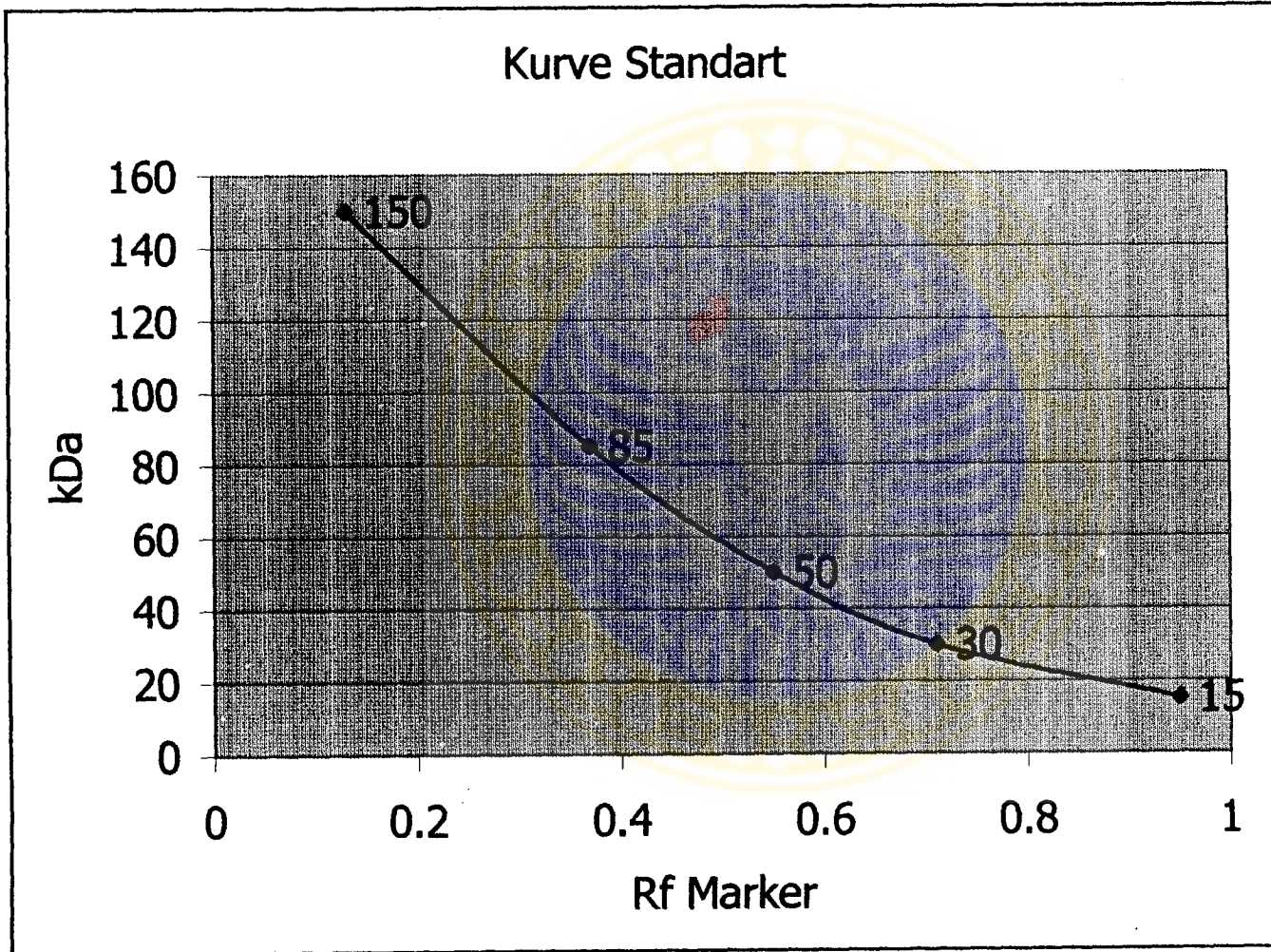
Lampiran 3.**Penentuan Berat Molekul Sumuran kolom 6-7**

Didapatkan nilai *Rf* berikut :

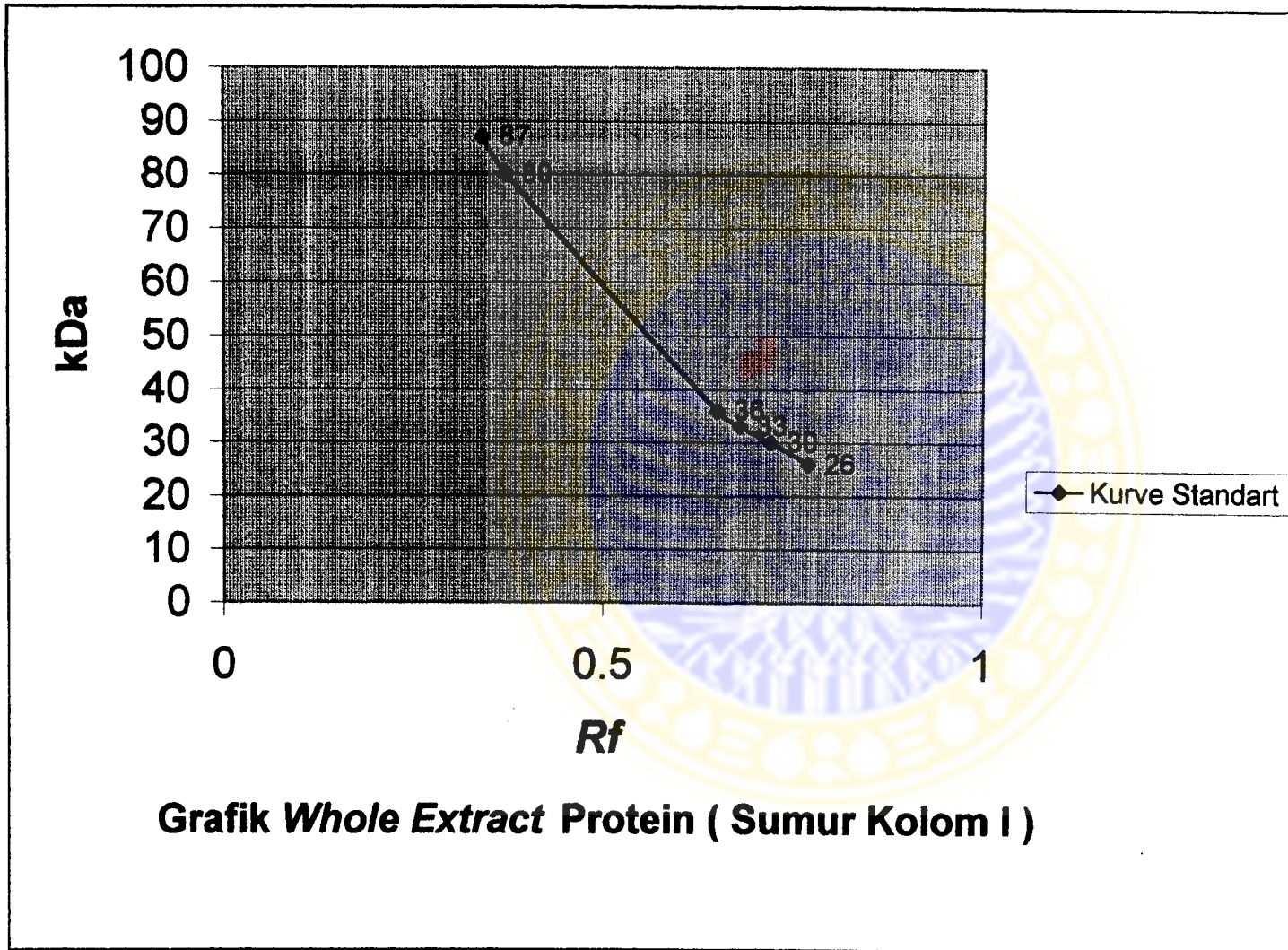
1. $Rf = 2,1 / 6,2 = 0,34$
2. $Rf = 2,3 / 6,2 = 0,37$
3. $Rf = 3,9 / 6,2 = 0,63$
4. $Rf = 4,0 / 6,2 = 0,65$
5. $Rf = 4,2 / 6,2 = 0,68$
6. $Rf = 4,3 / 6,2 = 0,69$
7. $Rf = 4,7 / 6,2 = 0,76$

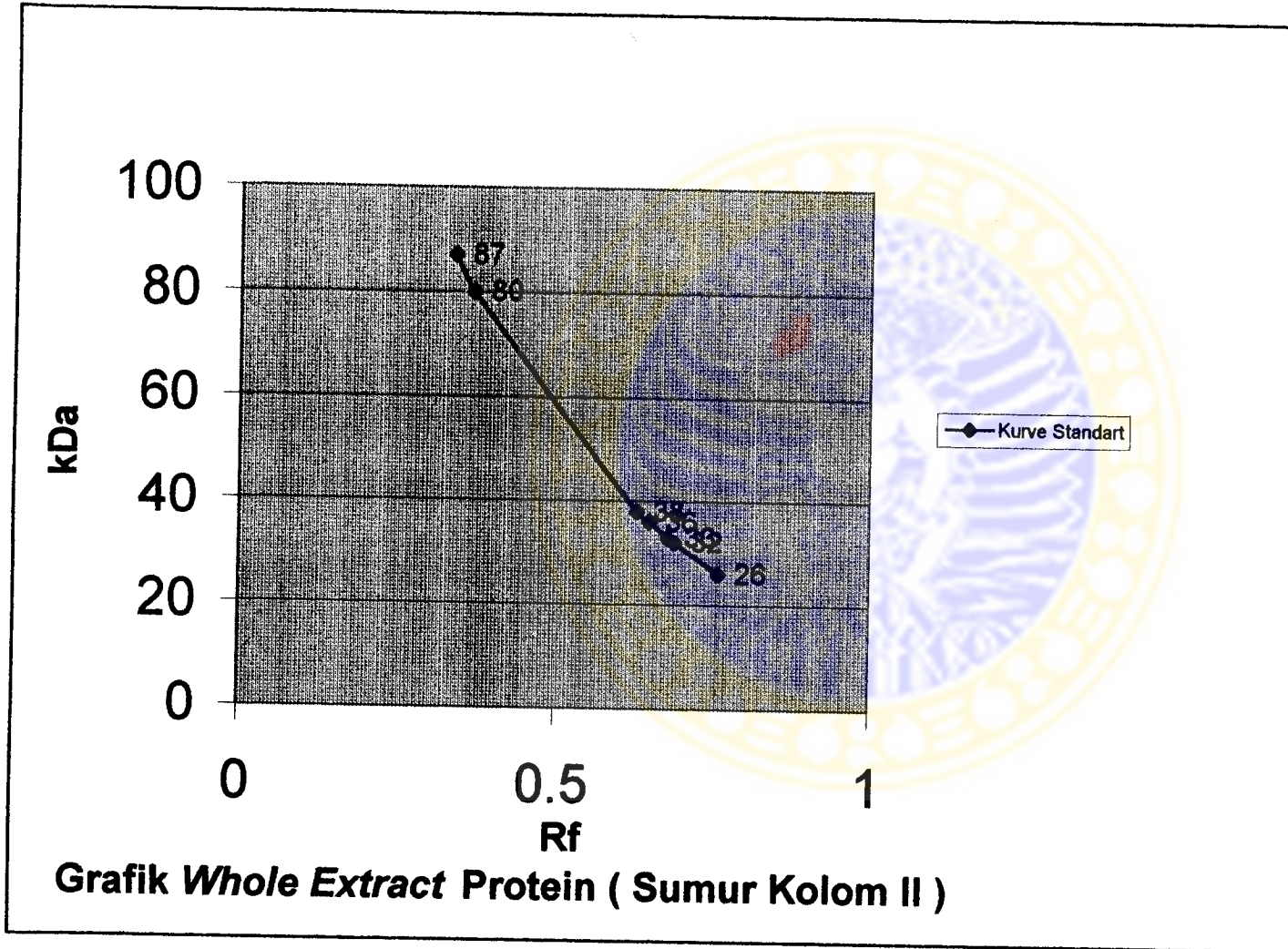
Dengan persamaan linier di atas dan dicari nilai *anti logaritme*, maka diperoleh protein dengan berat molekul sebagai berikut ;

1. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,34) = 1,9405$, *anti log* 1,9405 = 87, 19, dibulatkan 87 kDa
2. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,37) = 1,9035$, *anti log* 1,9035 = 80,08, dibulatkan 80 kDa
3. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,63) = 1,5830$, *anti log* 1,5830 = 38,28, dibulatkan 38 kDa
4. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,65) = 1,5583$, *anti log* 1,5583 = 36,17, dibulatkan 36 kDa
5. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,68) = 1,5214$, *anti log* 1,5214 = 33,22, dibulatkan 33 kDa
6. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,69) = 1,5090$, *anti log* 1,5090 = 32,28, dibulatkan 32 kDa
7. $Y = 2,3596 - 1,2327 (0,76) = 1,4228$, *anti log* 1,4228 = 26,47, dibulatkan 26 kDa.



Grafik *Whole extract* Protein Sumuran kolom 2-3





Lampiran 7. Bahan – bahan yang digunakan1. Bahan *Running (Separating) Gel* (12 %)

- Acrylamid	2.5 ml
- Tris HCl pH 8.8	1.2 ml
- SDS 0.5 %	1.2 ml
- Aquadest	1.1 ml
- Temed	5.0 μ l
- APS 10%	30 μ l

2. Bahan *Stacking Gel* (12 %)

- Acrylamid	0.66 ml
- Tris HCl pH 6.8	0.8 ml
- SDS 0.5 %	0.8 ml
- Aquadest	0.8 ml
- Temed	4.0 μ l
- APS 10%	20 μ l

3. Bahan Pencuci I :

- Methanol	25 ml
- Asam Asetat	3.75 ml
- Aquadest	71.25 ml

4. Bahan Pencuci II :

- Methanol	2.5 ml
- Asam Asetat	3.75 ml
- Aquadest	93.75 ml

5. Bahan Pencuci III : Glutaraldehyd 10%

- Glutaraldehyd	10 ml
- Aquadest	90 ml

6. Bahan Pencuci IV :

- Aquadest	100 ml
------------	--------

7. Pewarna silver :

AgNO ₃ 0.8 g dan 4 ml DW dimasukan larutan ;	
- NaOH 0.36 %	21 ml
- NH ₃	1.4 ml
- Aquadest	73.5 ml

8. Bahan Pengembang warna :

- Formaldehyd 3.7%	50 μ l
- Zitrensaure 5%	100 μ l
- Aquadest	100 ml

9. Bahan buffer inkubasi (pH 7.2)

- 0.1 M NaCl	5.844 g
- 50 mM Na phosphat	6.899 g
- Na H ₂ PO ₄	8.899 g
- 0.02 % NaH ₃	0.2 g
- 0.05 % Triton x 100	0.5 ml
Dalam 1 liter H ₂ O	

10. Bahan transfer buffer

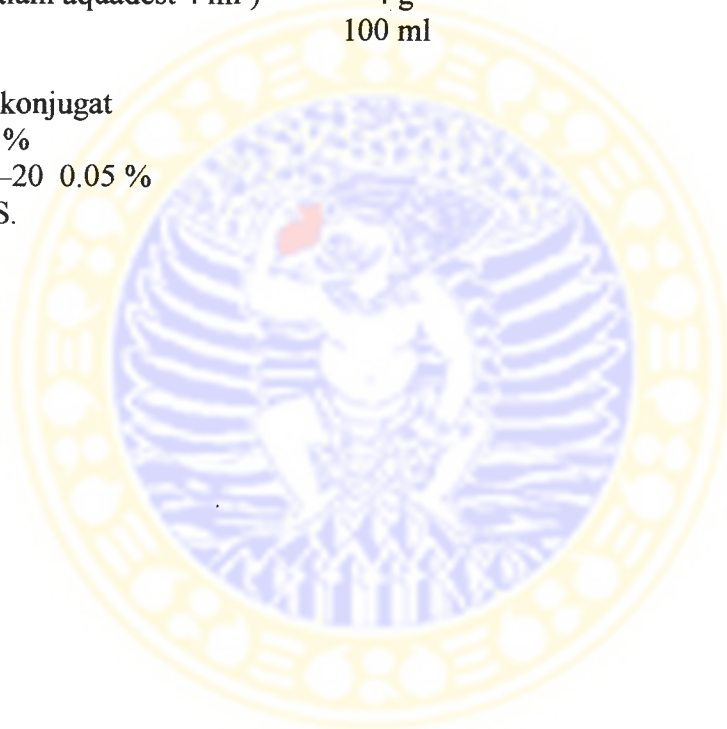
- 5x <i>running</i> buffer	100 ml
- H ₂ O	300 ml
- Met OH	100 ml

11. Bahan BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%

- BSA (Dalam aquadest 4 ml)	4 g
- Aquadest	100 ml

12. Bahan larutan konjugat

- Milk 5 %
- Tween-20 0.05 %
Dalam PBS.



Lampiran 8.

Prosedur Elektroforesis

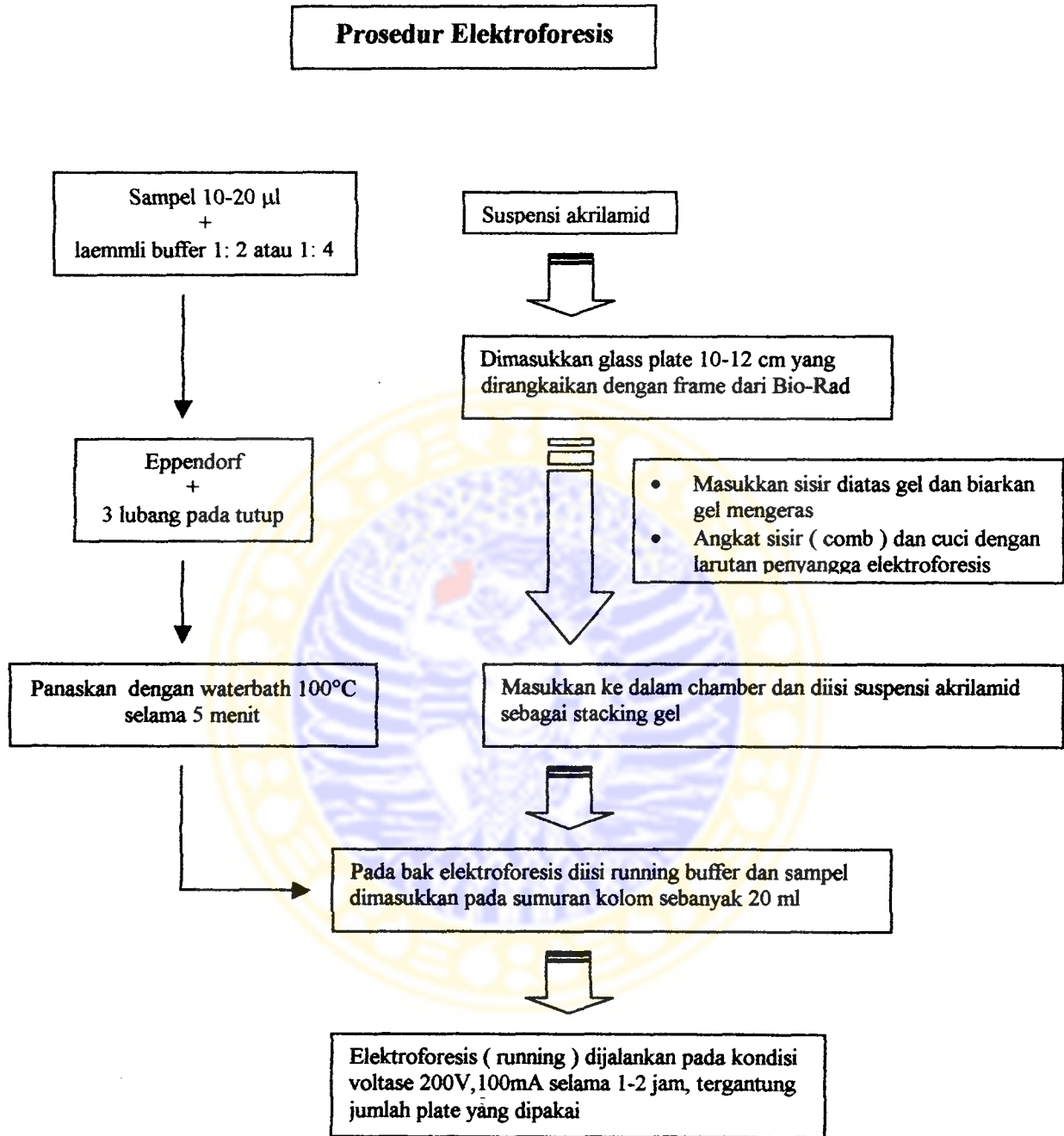


Diagram Alir SDS-PAGE

Diagram Alir SDS -PAGE 12%

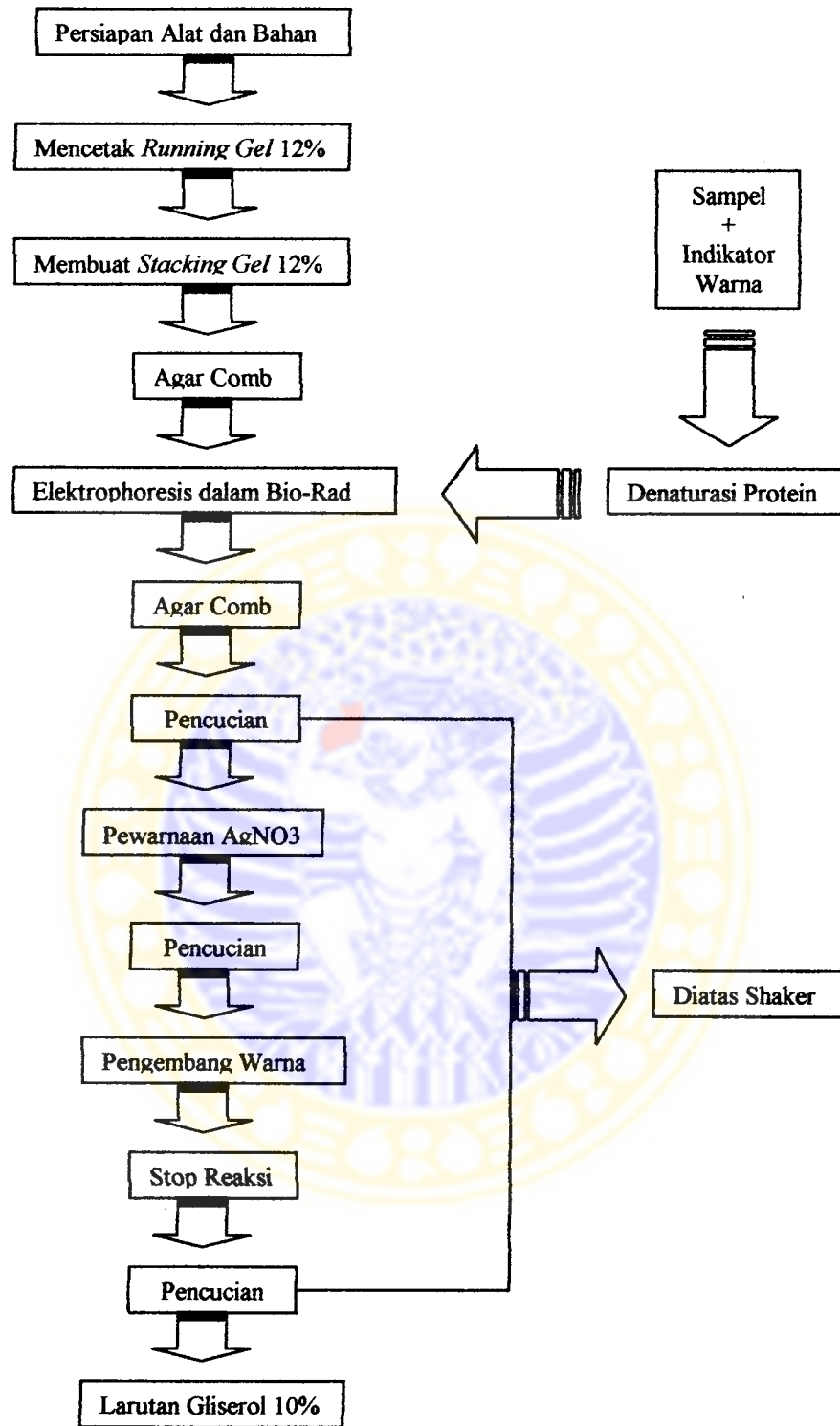


Diagram Alir Western Blot

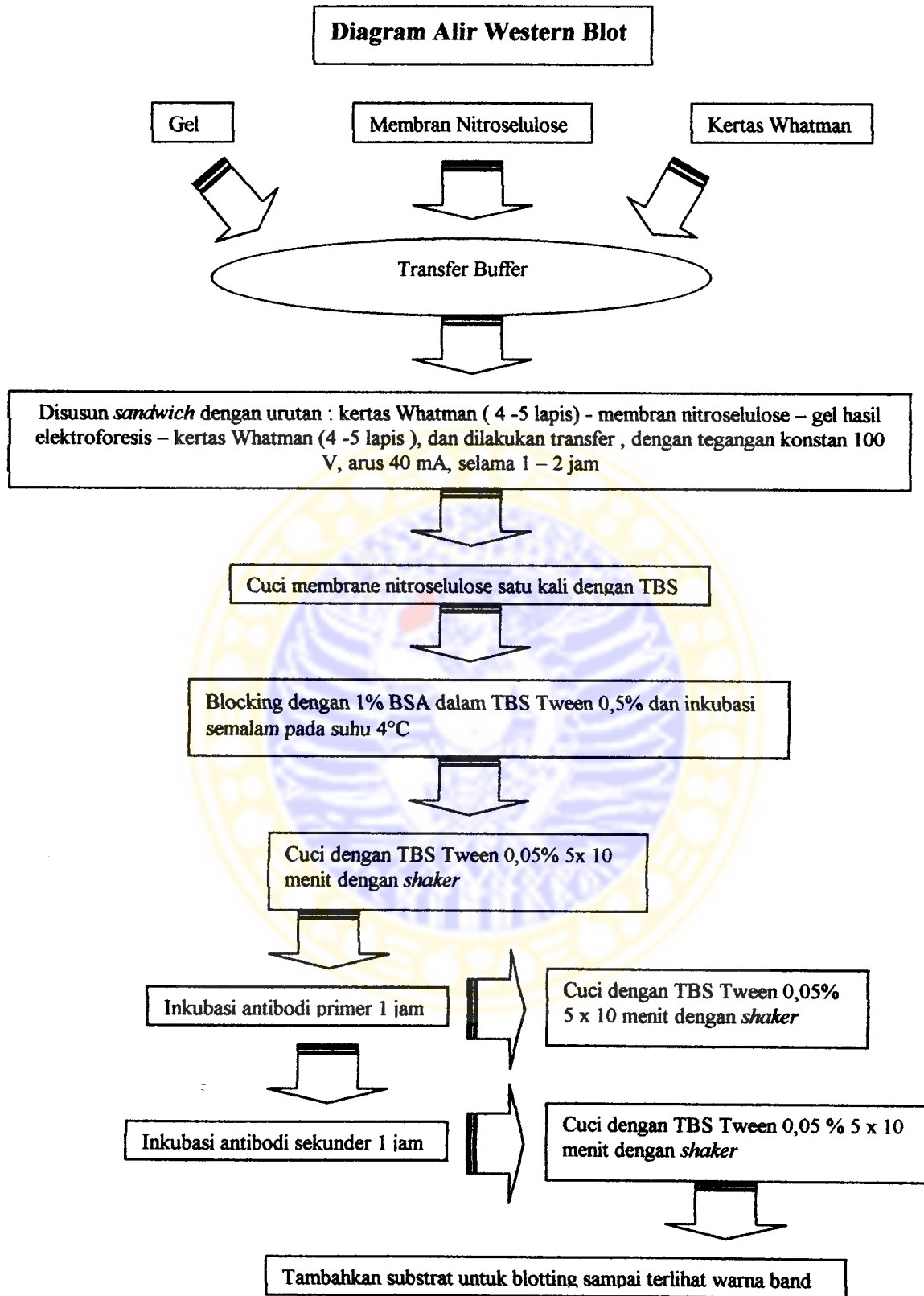
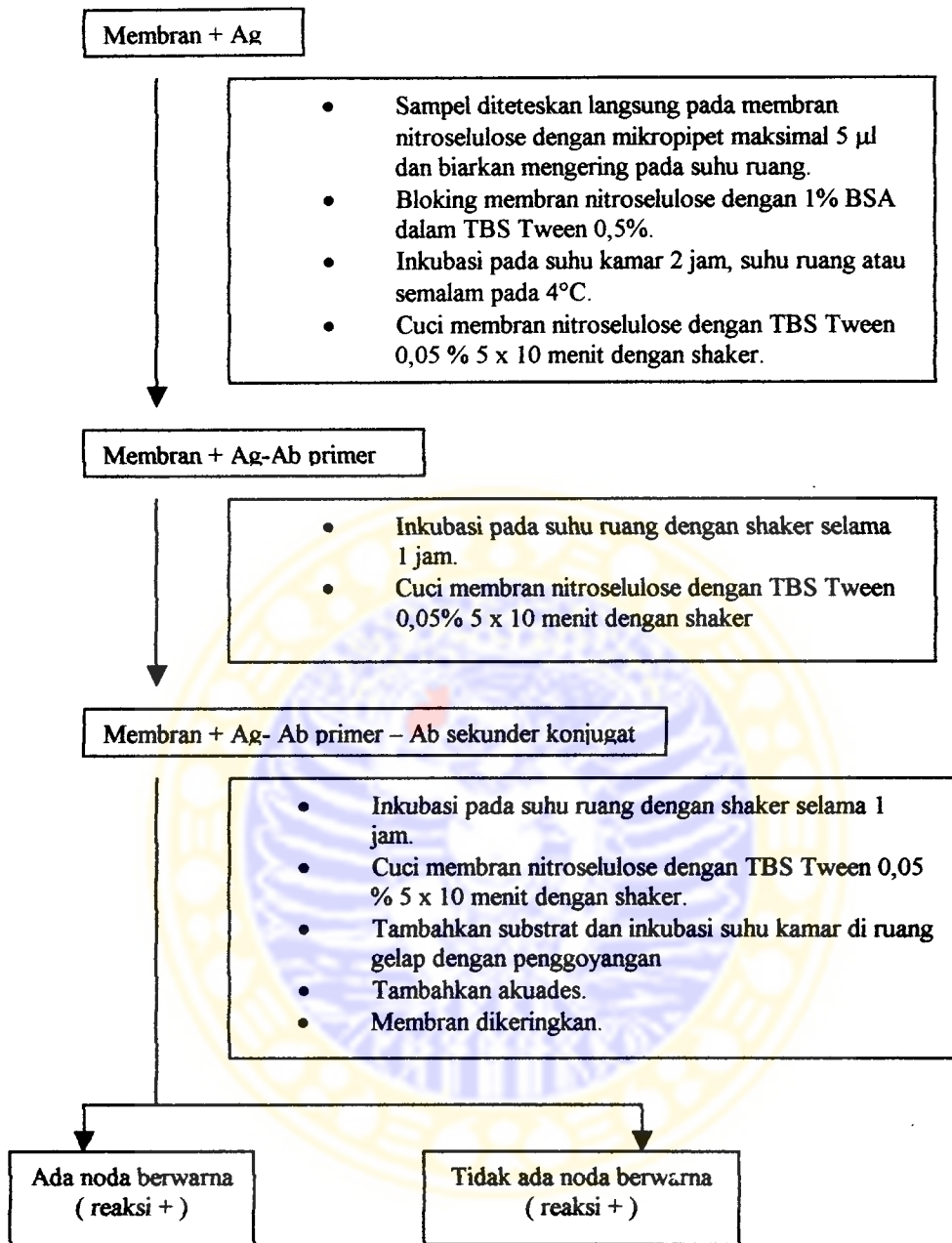


Diagram Alir Western Blot

Diagram alir Dot Blot



**IDENTIFIKASI PROTEIN TNF - α INTRATESTIKULAR PADA
MENCIT (*Mus musculus*) SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK
Phyllanthus niruri L SECARA PER – ORAL**

Nuria Ulfah

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran profil protein TNF - α intratestikular pada mencit jantan (*Mus musculus*) setelah pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara per – oral.

Sejumlah 15 ekor mencit jantan dengan berat badan sekitar 20 – 30 g diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis 4 mg/0,1 ml, 8 mg/0,1 ml, dan kontrol dengan pemberian aquades sebesar 0,1 ml, perlakuan dilakukan selama 35 hari (satu siklus spermatogenesis) dengan interval pemberian satu kali sehari, dan setiap perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit jantan. Secara acak dipilih 1 ekor mencit jantan dari kelompok kontrol, 4 ekor dari perlakuan I dengan dosis 4 mg/0,1 ml, dan 2 ekor dari perlakuan II dengan dosis 8 mg/0,1 ml, untuk kemudian dikorbankan dan diambil testisnya. Setelah dilakukan perlakuan pada testis, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan metode *Western Blot*.

Hasil *western blot* menunjukkan bahwa protein TNF - α intratestikular pada mencit mempunyai berat molekul sebesar 26 kDa.

Menyetujui,
Komisi pembimbing

Pembimbing I



Drh. Moh. Sukmanadi, M.Kes
NIP. 132 087 865

Pembimbing II



Drh. Sri Mulyati, M. Kes
NIP. 131 760 379

**PROFIL FRAKSI PROTEIN INTRATESTIKULAR PADA
MENCIT (*Mus Musculus*) SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK
Phyllanthus niruri L SECARA PER – ORAL**

Analisis Wisnu Wardhana

ABSTRAK

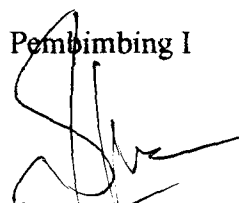
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran profil fraksi protein intratestikular pada mencit jantan (*Mus musculus*) setelah pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara per – oral.

Sejumlah 15 ekor mencit jantan dengan berat badan sekitar 20 – 30 g diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis 4 mg/0,1 ml, 8 mg/0,1 ml, dan kontrol dengan pemberian aquades sebesar 0,1 ml, perlakuan dilakukan selama 35 hari (satu siklus spermatogenesis) dengan interval pemberian satu kali sehari, dan setiap perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit jantan. Secara acak dipilih 1 ekor mencit jantan dari kelompok kontrol, 4 ekor dari perlakuan I dengan dosis 4 mg/0,1 ml, dan 2 ekor dari perlakuan II dengan dosis 8 mg/0,1 ml, untuk kemudian dikorbankan dan diambil testisnya. Setelah dilakukan perlakuan pada testis, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan metode SDS – PAGE 12%.

Hasil fraksinasi protein intratestikular pada mencit dengan menggunakan SDS PAGE, berupa separasi molekul berdasarkan fraksi-fraksi protein yang tampak pada gel polycrylamid, dengan metode elektroforesis telah didapatkan 6 fraksi protein yaitu: 87 kDa, 80 kDa, 36 kDa, 33 kDa, 30 kDa, dan 26 kDa.

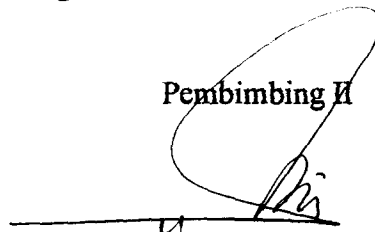
Menyetujui,
Komisi pembimbing

Pembimbing I



Drh. Lilik Maslachah
NIP. 132 061 818

Pembimbing II



Drh. Hardijanto, Ms
NIP. 130 687 302

EKSPRESI TNF - α AKIBAT STIMULASI EKSTRAK

Phyllanthus niruri L PADA TESTIS MENCIT

Sutrisna

ABSTRAK

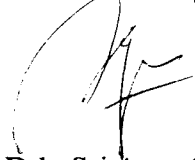
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi protein TNF - α intratestikular dan pengaruhnya terhadap kadar TNF - α intratestikular secara semi kuantitatif pada mencit jantan (*Mus musculus*) setelah pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara per - oral.

Sejumlah 15 ekor mencit jantan dengan berat badan sekitar 20 - 30 g diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis 4 mg/0,1 ml, 8 mg/0,1 ml, dan kontrol dengan pemberian aquades sebesar 0,1 ml, perlakuan dilakukan selama 35 hari (satu siklus spermatogenesis) dengan interval pemberian satu kali sehari, dan setiap perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit jantan. Secara acak dipilih 1 ekor mencit jantan dari kelompok kontrol, 4 ekor dari perlakuan I dengan dosis 4 mg/0,1 ml, dan 2 ekor dari perlakuan II dengan dosis 8 mg/0,1 ml, untuk kemudian dikorbankan dan diambil testisnya. Setelah dilakukan perlakuan pada testis, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan metode *Dot blot*.

Hasil *Dot blot* menunjukkan bahwa kadar TNF - α secara semi kuantitatif mengalami peningkatan pada dosis pemberian 4 mg/0,1 ml, dibanding pada pemberian 8 mg/0,1 ml. Hal ini ditunjukkan dengan gradasi warna yang ditimbulkan.

Menyetujui,
Komisi pembimbing

Pembimbing I



Drh. Sri Agus S. Ph D
NIP. 130 406 098

Pembimbing II



Drh Rimayanti, M Kes
NIP. 131 760 368