

# TESIS

## PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN *GRAPTOPHYLLUM PICTUM* (L).GRIFF. TERHADAP FUNGSI FAGOSITOSIS SERTA PEMBENTUKAN IMUNOGLOBULIN M DAN TNF - $\alpha$ PADA MENCIT

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



HK  
TF . 45 / 97  
KUS  
P

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"  
SURABAYA

**IDHA KUSUMAWATI**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1997**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL  
DAUN *GRAPTOPHYLLUM PICTUM* (L).GRIFF.  
TERHADAP FUNGSI FAGOSITOSIS SERTA  
PEMBENTUKAN IMUNOGLOBULIN M DAN TNF -  $\alpha$   
PADA MENCIT**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Farmasi  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**IDHA KUSUMAWATI  
NIM : 099511903 M**

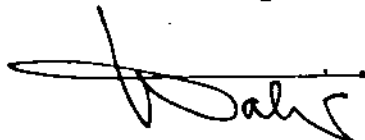
**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1997**

**LEMBAR PENGESAHAN**

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 14 MARET 1997

Oleh :

**Pembimbing Ketua**



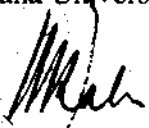
Dr. Wahjo Dyatmiko  
NIP : 130541815

**Pembimbing**



Dr. Mulja Hadi Santosa  
NIP : 130809084

Mengetahui  
Ketua Program Studi Ilmu Farmasi  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga

  
Dr. Widi Soeratri  
NIP : 130611501

Telah diuji pada  
Tanggal 28 Pebruari 1997

---

**PANITIA PENGUJI TESIS**

Ketua : Prof. Dr. Noor Cholies Zaini, Apt.

Anggota : Dr. Wahjo Dyatmiko, Apt.  
Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt.  
Dr. Noor Ifansyah, Apt.  
Dr. Suprpto Maat, Apt.

## DAFTAR ISI

|   | Halaman |
|---|---------|
| DAFTAR ISI.....   | i       |
| DAFTAR TABEL.....   | iii     |
| DAFTAR GAMBAR.....  | iv      |
| 1. PENDAHULUAN.....   | 1       |
| 1. Latar Belakang Masalah.....  | 1       |
| 2. Rumusan Masalah.....   | 3       |
| 3. Tujuan Penelitian.....   | 3       |
| 3.1. Tujuan Umum.....   | 3       |
| 3.2. Tujuan Khusus.....   | 3       |
| 4. Manfaat Penelitian.....  | 4       |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA.....  | 5       |
| 1. Tinjauan tentang tanaman <i>Graptophyllum pictum</i> (L).Griff. .... | 5       |
| 1.1. Klasifikasi.....   | 5       |
| 1.2. Nama Daerah.....   | 5       |
| 1.3. Morfologi.....   | 6       |
| 1.4. Kegunaan Tanaman.....  | 6       |
| 1.5. Kandungan Tanaman.....   | 7       |
| 1.6. Efek Antiinflamasi <i>Graptophyllum pictum</i> (L).Griff. ....     | 7       |
| 2. Inflamasi.....   | 8       |
| 3. Obat-obat antiinflamasi.....   | 11      |
| 4. Flavonoid.....   | 13      |
| 4.1. Aktivitas Flavonoid pada Sistem Imun.....                          | 14      |
| 4.2. Analisa Kuantitatif.....   | 15      |
| 5. Uji Bioaktivitas Immunomodulasi.....                                 | 15      |
| 5.1. Pengujian Terhadap Fungsi Fagositosis Sel-sel Inflamasi.....       | 16      |
| 5.2. Pengujian Kemoluminesen.....                                       | 17      |
| 5.3. Pengujian Kemotaksis.....  | 17      |
| 5.4. Pengujian Proliferasi Limfosit.....                                | 18      |
| 5.5. Pengujian Aktivitas Sel Natural Killer (NK).....                   | 19      |
| 5.6. Pengujian Terhadap Sekresi TNF- $\alpha$ .....                     | 21      |
| 5.7. Pengujian Terhadap Komplemen.....                                  | 22      |
| 5.8. Pengujian Terhadap Produksi Ig M.....                              | 24      |
| 6. Sistem Imunitas Mencit.....  | 25      |
| 3. HIPOTESIS PENELITIAN.....  | 26      |
| 1. Landasan Teori.....  | 26      |
| 2. Hipotesis Penelitian.....  | 27      |
| 4. METODE PENELITIAN.....   | 28      |
| 1. Rancang Bangun Penelitian.....                                       | 28      |
| 2. Variabel Penelitian.....   | 29      |
| 3. Materi Penelitian.....   | 29      |
| 4. Instrumen Penelitian, Prosedur Kerja dan Teknik Analisa Data.....    | 32      |
| 4.1. Persiapan Sampel Penelitian.....                                   | 32      |
| 4.1.1. Pembuatan Ekstrak Bahan.....                                     | 32      |
| 4.1.2. Penetapan Kadar Flavonoid Total.....                             | 32      |
| 4.1.3. Pembuatan Profil Ekstrak Etanol Daun Ungu dengan HPLC.....       | 33      |
| 4.1.4. Preparasi Sediaan Untuk Pemberian Peroral.....                   | 33      |
| 4.2 Uji Bioaktivitas.....   | 34      |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.1. Uji Fagositosis Sel-sel Granulosit In Vivo.....                 | 34 |
| 4.2.2. Respon antibodi primer (IgM).....                               | 35 |
| 4.2.3. Pengujian Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )..... | 36 |
| 5. Lokasi dan Waktu Penelitian.....                                    | 37 |
| 6. HASIL DAN ANALISA DATA .....  | 38 |
| 1. Preparasi Sediaan Untuk Pemberian Per-oral .....                    | 38 |
| 2. Uji Bioaktivitas .....  | 42 |
| 2.1. Uji Terhadap Fungsi Fagositosis .....                             | 42 |
| 2.2. Uji Hemaglutinasi IgM .....                                       | 43 |
| 2.3. Uji Terhadap Sekresi TNF-a .....                                  | 46 |
| 8. SIMPULAN DAN SARAN .....  | 51 |
| DAFTAR PUSTAKA .....   | 52 |

## DAFTAR TABEL

|  |    |
|--|----|
| Tabel 5.1. Kadar Flavonoid total ekstrak etanol Daun Ungu dengan metode Spektrofotometri dari Farmakope Swiss VII..... | 38 |
| Tabel 5.2. Indeks Fagositosis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.....   | 43 |
| Tabel 5.3. Titer Aglutinasi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.....   | 44 |
| Tabel 5.4. Optical Density Unit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan metode ELIZA.....                       | 45 |

## DAFTAR GAMBAR

|   |    |
|---|----|
| Gambar 4.1. <i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.....                               | 30 |
| Gambar 5.1. Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Ungu dengan HPLC                   | 39 |
| Gambar 5.2. Profil Kromatogram Hidrolisat Ekstrak Etanol Daun Ungu....<br>dengan HPLC | 40 |
| Gambar 5.3. Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Ungu dengan HPLC                   | 41 |



## UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji dan syukur ke hadirat Allah yang Maha Kuasa atas rahmatNya kepada saya selama ini, hingga saya dapat menyelesaikan tesis ini sebagai persyaratan pendidikan Pascasarjana Program Studi Ilmu Farmasi di Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini perkenankanlah saya menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada :

- a. Almamater Universitas Airlangga khususnya Fakultas Farmasi dan Program Pascasarjana yang telah memberikan kesempatan, bantuan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti program pendidikan Pascasarjana.
- b. Jurusan Biologi Farmasi khususnya Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi dan Laboratorium Litbang Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah menyediakan fasilitas selama melakukan penelitian ini.
- c. Bapak Dr. Wahjo Dyatmiko dan bapak Dr. Mulja Hadi Santosa sebagai pembimbing saya, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk dapat mengikuti pendidikan Pascasarjana, dan juga telah memberikan bimbingan selama saya mengikuti program pendidikan hingga terselesainya tesis ini.
- d. Bapak Dr. Suprpto Ma'at sebagai konsultan dalam penelitian ini, yang telah memberikan bimbingan selama saya menyelesaikan tesis ini serta segala fasilitas yang telah diberikan kepada saya.
- e. Para sejawat staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, khususnya dari Jurusan Biologi Farmasi yang selalu memberikan dorongan, saran dan kerjasama yang baik selama saya mengikuti program pendidikan ini.

f. Kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu demi satu, yang telah membantu ataupun memberikan dorongan kepada saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhirnya, terima kasih juga sampaikan kepada Ayah, Ibu, kedua kakak dan adik saya yang selalu memberikan dorongan semangat selama saya mengikuti program pendidikan ini.

Semoga Allah swt. senantiasa memberikan balasan yang melimpah.

Surabaya, 28 Pebruari 1997

Penulis

## RINGKASAN

Daun Ungu [*Graptophyllum pictum* (L.) Griff] banyak digunakan oleh masyarakat secara tradisional untuk pengobatan bengkak, bisul, wasir dan untuk melancarkan menstruasi (Heyne, 1987). Ozaki dan kawan-kawan telah membuktikan aktivitasnya sebagai antiinflamasi (Ozaki, 1989).

Inflamasi adalah respon protektif yang sangat diperlukan dalam tubuh sebagai upaya untuk mengembalikan ke keadaan sebelum kerusakan atau untuk memperbaiki sesudah terjadi kerusakan (Belanti, 1993).

Namun demikian, perlu diketahui bahwa jika respon inflamatoris menyimpang dari kebiasaan, dapat terjadi masalah yang serius. Banyak penyakit yang dihadapi para klinisi disebabkan karena respon inflamatoris yang tidak terkendali, misalnya kerusakan sendi pada artritis reumatoid, kerusakan fungsional dan struktural pada glomerulo nephritis dan penyakit demyelinisasi sistem saraf pusat. Ataupun pada penyakit-penyakit inflamasi yang lain seperti pulmonaris fibrosis, psoriasis. Pada penyakit-penyakit tersebut ditemukan adanya penumpukan jumlah netrofil dan netrofil menjadi aktif untuk mensekresi mediator inflamasi yang dapat merusak jaringan. Pengobatan dari kejadian-kejadian ini adalah terapi anti inflamasi (Belanti, 1993).

Penelitian ini adalah suatu upaya untuk mengetahui aktivitas Daun Ungu terhadap beberapa komponen sistem imun yang terkait dengan aktivitasnya sebagai antiinflamasi yaitu uji terhadap fungsi fagositosis, serta uji terhadap kemampuan pembentukan Imunoglobulin M dan Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . Uji terhadap fungsi fagositosis dilakukan dengan melihat kemampuan sel-sel fagosit untuk menelan mikroorganisme atau partikel asing. Pembentukan antibodi primer atau Ig M dapat

diketahui dengan uji hemaglutinasi terhadap antigen sel darah merah domba. Sedangkan kemampuan sekresi TNF- $\alpha$  diuji dengan menggunakan ELIZA.

Dosis Imunologis yang digunakan adalah 0,2 ml suspensi ekstrak etanol Daun Ungu 1,02% yang setara dengan 0,2 ml infus 10%, dengan pemberian peroral setiap hari selama 7 hari.

Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa Daun Ungu tidak mempengaruhi pembentukan antibodi primer, fungsi fagositosis dan aktifitas makrofag dalam mensekresi TNF- $\alpha$  yang dapat menjadi penyebab kerusakan jaringan lebih lanjut pada penyakit-penyakit yang dikarakterisasi oleh inflamasi. Disamping itu, dari penelitian yang dilakukan oleh Ozaki dkk, dapat diketahui bahwa fraksi yang aktif sebagai antiinflamasi dari ekstrak etanol Daun Ungu diduga mengandung flavonoid. Untuk itu dalam penelitian ini juga telah dilakukan pembuatan profil kandungan ekstrak etanol Daun Ungu dan hasil hidrolisanya secara HPLC. Dari profil tersebut terlihat adanya puncak yang sama dengan puncak Myricetin dan Kaempferol. Dari penetapan kadar flavonoid totalnya dapat diketahui bahwa ekstrak tersebut mengandung 1,78 % flavonoid. Jadi dengan dosis 0,2 ml suspensi ekstrak etanol 1,02% mengandung flavonoid total sebesar 0,036 mg.

## ABSTRACT

The antiinflammatory activity of the ethanol extract obtained from the red leaves of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff. had been reported. On the basis of these activity, the present study was carried out to examine the immunological effect of these extract. After oral administration for 7 days, 0.2 ml of 1.02% extract suspension, the results indicated that these extract did not significantly inhibit the phagocytic function of granulocytes, the TNF- $\alpha$  production by lipopolysaccharide-activated macrophages and the ability of B lymphocyte to synthesize Immunoglobulin M. The total flavonoid content of these extract was 1.78%. Myricetin and kaempferol were found in these extract by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis.

Key words : *Graptophyllum pictum* (L.) Griff.

Imunological effect

Total flavonoid content

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1. LATAR BELAKANG MASALAH

Dunia tanaman masih merupakan lahan penelitian yang sangat luas guna mendapatkan bahan obat baru. Sampai saat ini baru kurang lebih 1% dari 250.000 spesies tanaman yang diduga mengandung obat, dimanfaatkan untuk pengobatan (Dey,1991). Hanya saja, pengetahuan tentang khasiat dan keamanan obat alami ini kebanyakan didasarkan pada informasi turun temurun yang belum diuji secara ilmiah. Oleh karena itu, penelitian obat tradisional penting untuk menggali potensi negara kita dalam bidang pengobatan alternatif yang kompetitif yang berkualitas baik dan dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah.

Salah satu tanaman obat tersebut adalah Daun Ungu [*Graptophyllum pictum* (L.)Griff)] yang banyak digunakan oleh masyarakat secara tradisional untuk pengobatan bengkak, bisul, wasir dan untuk melancarkan menstruasi (Heyne,1987). Ozaki dan kawan-kawan telah membuktikan aktivitasnya sebagai antiinflamasi dengan metoda penghambatan edema yang diinduksi oleh carragenan, penurunan writhing yang diinduksi oleh asam asetat, dan peningkatan permeabilitas vaskular yang diinduksi oleh asam asetat (Ozaki,1989).

Inflamasi adalah reaksi tubuh terhadap masuknya benda asing, invasi mikroorganisme atau kerusakan jaringan. Terjadinya reaksi inflamasi ini dimaksudkan untuk melokalisir infeksi dan memudahkan eliminasi patogen. Jadi inflamasi adalah respon protektif yang sangat diperlukan dalam tubuh sebagai upaya untuk mengembalikan ke keadaan sebelum kerusakan atau untuk memperbaiki sesudah terjadi kerusakan (Belanti,1993). Prosesnya meliputi suatu seri kompleks yang terdiri dari

vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, eksudasi cairan dan migrasi leukosit. Penumpukan dan selanjutnya aktivasi leukosit adalah kejadian utama pada patogenesis semua bentuk inflamasi. Leukosit bermigrasi dan menumpuk di tempat inflamasi karena adanya produksi lokal kemoatraktan, dan kemudian mengaktifasi sekresi kandungan granulanya serta melepaskan metabolit oksigen aktif selama kemotaksis dan fagositosis (Im Lee.1995).

Namun demikian, perlu diketahui bahwa jika respon inflamatoris menyimpang dari kebiasaan, dapat terjadi masalah yang serius. Banyak penyakit yang dihadapi para klinisi disebabkan karena respon inflamatoris yang tidak terkendali, misalnya kerusakan sendi pada artritis reumatoid, kerusakan fungsional dan struktural pada glomerulo nephritis dan penyakit demyelinisasi sistem saraf pusat, juga pada pulmonaris fibrosis dan psoriasis. Pada penyakit-penyakit tersebut ditemukan adanya penumpukan jumlah netrofil dan netrofil menjadi aktif untuk mensekresi mediator inflamasi yang dapat merusak jaringan. Pengobatan dari kejadian-kejadian ini adalah terapi anti inflamasi yang mempunyai mekanisme kerja menekan fungsi sel-sel inflamasi (Belanti,1993).

Berdasarkan teori-teori diatas, maka dapat diperkirakan bahwa Daun Ungu, yang telah menunjukkan aktivitas antiinflamasi, dapat menekan fungsi fagositosis sel inflamasi, menurunkan pembentukan antibodi primer Immunoglobulin M (sebagai respon imun) serta menurunkan sekresi TNF- $\alpha$  oleh monosit/makrofag sebagai mediator inflamasi. Disamping itu, dari penelitian yang dilakukan oleh Ozaki dkk, dapat diketahui bahwa fraksi yang aktif sebagai antiinflamasi dari ekstrak etanol Daun Ungu diduga mengandung flavonoid. Untuk itu dalam penelitian ini juga akan dilakukan pembuatan profil kandungan ekstrak etanol Daun Ungu secara HPLC serta penetapan kadar flavonoid totalnya.

## 2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang tersebut, timbul permasalahan sebagai berikut :

Berkaitan dengan aktivitasnya sebagai antiinflamasi, apakah pemberian peroral ekstrak etanol Daun Ungu pada mencit :

1. dapat menekan fungsi fagositosis sel inflamasi ?
2. dapat menghambat pembentukan Ig M ?
3. dapat menghambat sekresi TNF- $\alpha$  ?

## 3. TUJUAN PENELITIAN

### 3.1. TUJUAN UMUM

Untuk memperoleh data ilmiah mengenai landasan bioaktivitas ekstrak etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) sebagai antiinflamasi yang terkait dengan sistem imun.

### 3.2. TUJUAN KHUSUS

1. Untuk mengetahui apakah pemberian peroral ekstrak etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) pada mencit dapat menekan fungsi fagositosis sel inflamasi.
2. Untuk mengetahui apakah pemberian peroral ekstrak etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) pada mencit dapat menghambat pembentukan antibodi primer Immunoglobulin M.
3. Untuk mengetahui apakah pemberian peroral ekstrak etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) pada mencit dapat menghambat sekresi TNF- $\alpha$ .



#### **4.MANFAAT PENELITIAN**

1. Dapat menjadi data awal mengenai landasan bioaktivitas ekstrak etanol Daun Ungu sebagai antiinflamasi.
2. Membuka lahan penelitian lanjutan ekstrak etanol Daun Ungu terutama mengenai zat kandungan aktifnya.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1. TINJAUAN TENTANG TANAMAN *GRAPTOPHYLLUM PICTUM* (L).GRIFF.

##### 1.1.KLASIFIKASI(Backer C.A.,1963)

|             |   |
|-------------|---|
| Divisi      | : Spermatochyta                         |
| Anak divisi | : Angiospermae                          |
| Kelas       | : Dicotyledonae                         |
| Anak kelas  | : Sympetalae                            |
| Bangsa      | : Solanales                             |
| Suku        | : Acanthaceae                           |
| Marga       | : <i>Graptophyllum</i>                  |
| Jenis       | : <i>Graptophyllum pictum</i> (L)Griff. |

##### 1.2.NAMA DAERAH(Heyne K.,1987)

|         |  |
|---------|--|
| Melayu  | : Dangora, daun putri, puding, puding perada |
| Sunda   | : Daun ungu, daun temen-temen, handeleum     |
| Jawa    | : Demung, tulak, wungu                       |
| Madura  | : Karaton, karotong                          |
| Bali    | : Temen                                      |
| Ternate | : Kabi-kabi                                  |
| Tidore  | : Dongo-dongo                                |

### 1.3. MORFOLOGI

*Graptophyllum pictum* (L.) Griff. berupa perdu tegak atau kecil tingginya mencapai 1,5 - 3 m, biasanya dijumpai di dataran rendah sampai 1250 m di atas permukaan laut, di tempat-tempat terbuka dengan iklim kering atau lembab. Sering dimanfaatkan sebagai tanaman pagar. Tumbuhan ini dengan mudah dapat disebarluaskan dengan cara stek, tumbuh cepat dan tidak banyak memerlukan perawatan.

Daun letaknya berhadapan, bentuk lonjong atau lanset, melancip panjang atau pendek, tepi daun rata atau berombak. Ukuran panjang sampai 20 cm, lebar 3 sampai 13 cm, tangkai daun 0,5 - 1 cm.

Bunganya berwarna merah tua, tersusun dalam rangkaian berupa tandan yang tumbuh pada ujung tangkai. Bunga seluruhnya atau sebagian besar tersusun dalam suatu panikula bagian terminal yang panjangnya 3 sampai 12 cm. Setiap panikula terdiri dari simosa-simosa kecil dalam kedudukan berhadapan yang terdapat sepanjang rakis utama. Buahnya kotak yang bentuknya jorong, berisi 2 biji yang bentuknya bulat. Terdapat tiga varietas dari spesies tanaman ini yaitu :

1. varietas **viride** (Hassk) sub *G hortense* Nees, seluruh daunnya hijau
2. varietas **album** (Bl) sub *Justicia picta* L daunnya berwarna hijau terang dengan bintik pucat (kuning atau putih) sepanjang tulang tengah daun
3. varietas **lurido-sanguineum** (Sims) sub *Justicia picta* L daunnya berwarna ungu (Heyne K., 1987).

### 1.4. KEGUNAAN TANAMAN SEBAGAI OBAT TRADISIONAL

Kulit tanaman ini ditumbuk dan diletakkan pada berbagai bengkak baru, dapat melenyapkan bengkak itu, juga daunnya dilayukan dan diperam supaya masak, daun dari forma balang-balang merah oleh perempuan Ternate sangat dihargai sebagai obat

untuk menyembuhkan bisul di dada. Daun itu lebih dahulu diolesi santan kelapa lalu dipanaskan di atas api, kemudian diletakkan di tempat yang sakit. Daun dari forma merah digiling hingga menjadi bubur, dipandang lebih cocok untuk mematangkan bengkak dan bisul yang panas. Demikian pula di Jawa, daun ini mempunyai reputasi yang besar sebagai obat untuk menyembuhkan bawasir, dan bunganya di minum seperti teh berguna untuk melancarkan menstruasi(Heyne K.,1987).

### 1.5.KANDUNGAN TANAMAN

*Graptophyllum pictum* (L).Griff. var *lurido-sanguineum* mengandung tanin, alkaloid, sitosterol dan glikosida. Juga mengandung sedikit flavonoid dan polifenol (Hegnauer,1964). Dan pada penelitian terdahulu yang telah dilakukan pada daun tanaman ini ditemukan adanya steroida(Farida A,1986).

### 1.6.EFEK ANTIINFLAMASI *GRAPTOPHYLLUM PICTUM* (L). GRIFF.

Dari studi yang telah dilakukan Ozaki dkk. menunjukkan bahwa ekstrak etanol 50 % daun *Graptophyllum pictum* (L). Griff. dapat menghambat edema yang diinduksi dengan Carragenin, meningkatkan permeabilitas vaskuler yang diinduksi dengan asam asetat dan menurunkan writhing yang diinduksi dengan asam asetat. disamping itu ekstrak ini juga menunjukkan efek analgesik. Fraksi Metanol dari ekstrak etanol yang aktif sebagai antiinflamasi mengandung flavonoid.(Ozaki,1989).

## 2. INFLAMASI

Inflamasi dapat dipandang sebagai satu seri peristiwa kompleks yang berkembang bila tubuh mendapat injuri secara mekanik atau agen kimia karena proses penghancuran diri (autoimun). Meskipun ada kecenderungan untuk menganggap respon inflamasi sebagai reaksi yang merugikan tubuh namun sebenarnya inflamasi adalah respon protektif yang sangat diperlukan tubuh dalam upaya untuk mengembalikan ke keadaan sebelum injuri atau untuk memperbaiki setelah terjadi injuri (Bellanti, 1993).

Respon inflamasi dinyatakan dengan dilatasi pembuluh darah dan pengeluaran leukosit dan cairan, akibatnya adalah kemerahan karena dilatasi pembuluh darah, pembengkakan karena masuknya cairan ke dalam jaringan dan kekakuan karena pengumpulan cairan dan sel-sel inflamasi.

Respon inflamasi berasal dari sel (neutrofil, eosinofil, basofil, makrofag, sel mast, platelet dan endotel) dan dari protein sirkuler (komponen komplemen, koagulasi, fibrinolisis dan jalan kinin). Respon inflamasi selluler adalah mekanisme pertahanan melawan infeksi dan perbaikan kerusakan jaringan. Beberapa sel inflamasi (neutrofil dan makrofag) mempunyai fungsi primer fagositosis dan yang lain (sel mast dan basofil) mensekresi mediator inflamasi. Sel fagosit, dengan mengeliminasi partikel atau organisme yang masuk ke host, bertindak sebagai barrier protektif.

Sebaliknya sel sekret mengandung mediator inflamasi, yang dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler, dan faktor kemotaktik yang menarik sel inflamasi dan membantu pertahanan host dengan meningkatkan efek sel fagosit atau berpengaruh langsung pada sel target (Stites and Terr, 1991).

Beraneka ragam faktor yang dapat merangsang terjadinya respon inflamasi adalah sebagai berikut :

## A. MEDIATOR PEPTIDA

**Sitokin** merupakan "hormone-like polipeptida" yang berfungsi sebagai sinyal intraseluler yang mengatur respon inflamasi lokal maupun sistemik. Berbeda dengan hormon endokrin, sitokin tidak diproduksi oleh kelenjar khusus tetapi oleh sel. Sitokin mengatur reaksi host terhadap antigen asing atau agen yang menyebabkan injuri, dengan pengaturan pertumbuhan, mobilitas dan differensiasi leukosit dan sel yang lain.

Sitokin yang diproduksi limfosit disebut **limfokin**, sedangkan yang diproduksi oleh monosit atau makrofag disebut **monokin**. Beberapa sitokin pivotal yang dapat meningkatkan respon imun dari inflamasi adalah interleukin, tumor nekrosis factor, interferon, colony-stimulating factor dan faktor pertumbuhan dan kemotaktik (Stites and Terr, 1991).

## B. KOMPLEMEN

Komplemen merupakan sistem kompleks yang tersusun lebih dari 25 protein. Aktivasi sistem komplemen menghasilkan interaksi berantai, yang menghasilkan produk-produk yang mempunyai aktivitas biologik dan yang menyusun suatu sistem mediator humoral yang penting dalam reaksi inflamasi. Pertama menyebabkan lisis sel, bakteri dan *envelope-virus*. Yang kedua sebagai perantara proses opsonisasi sel, bakteri, virus dan jamur asing sehingga dapat difagosit. Dan fungsi ketiga adalah membentuk fragmen peptida yang mengatur respon kinin dan inflamasi.

Protein ini berperan dalam vasodilatasi pada daerah inflamasi sehingga dapat memudahkan sel-sel fagosit mencapai daerah inflamasi (Stites and Terr, 1991).

## C. FAKTOR LIPIDA

Setelah aktivasi leukosit yang disebabkan berbagai macam agen asing, fosofolipase yang terikat pada membran diaktifkan, yang mengakibatkan pelepasan

asam arakidonat. Dari sini, metabolisme arakidonat berjalan melalui dua jalur yaitu jalur siklooksigenase yang menghasilkan prostaglandin, prostasiklin dan tromboksan, serta jalur kedua adalah jalur lipooksigenase yang menghasilkan leukotrien. Fungsi biologik produk siklooksigenase adalah mempengaruhi vasodilatasi, edema dan agregasi trombosit. Sedangkan leukotrien, produk jalur lipooksigenase, mempengaruhi aktivitas kemotaktik dan kontraksi otot polos, termasuk respon leukosit terhadap rangsang kemotaktik (Stites and Terr, 1991).

#### D. IMUNOLOGI

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.

Pertahanan tersebut terdiri dari sistem imun alamiah (non spesifik) dan sistem imun yang didapat (spesifik). Sistem imun non spesifik adalah merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, sehingga dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Sedangkan sistem imun spesifik membutuhkan waktu untuk mengenal antigen terlebih dahulu sebelum dapat memberikan responnya. Sistem tersebut disebut non spesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir yang berupa permukaan tubuh dan berbagai komponen dalam tubuh.

Berbeda dengan sistem imun non spesifik, sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali muncul segera dikenali oleh sistem imun spesifik sehingga terjadi sensitisasi sel-sel sistem imun tersebut (Karnen, 1991).

Meskipun inflamasi merupakan pertahanan yang efisien melawan invasi mikroorganisme patogen dan perbaikan dari infeksi, namun sel dan mediator yang berpartisipasi dalam respon inflamasi juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Jadi respon lain yang timbul terhadap suatu infeksi dapat dikatakan sebagai pisau bermata dua karena pada suatu keadaan membersihkan proteksi terhadap adanya invasi benda asing, tapi pada hal-hal tertentu dapat menyebabkan keadaan yang merugikan atau bahkan menimbulkan penyakit yang lain pada tubuh host. Sebagai contoh adalah terjadinya syok oleh endotoksin yang biasanya ditimbulkan oleh infeksi bakteri gram negatif, meskipun endotoksin dapat menyebabkan aktivasi sistem komplemen dan sistem koagulasi, namun dapat dibuktikan dengan penelitian bahwa terjadinya sepsis tersebut distimulasi oleh mediator interleukin dan tumor necrosis factor (TNF) yang disekresi oleh makrofag.

Contoh yang lain adalah terjadinya penyakit kompleks imun, seperti glomerulo nephritis setelah infeksi streptokokus. Kompleks imun yang larut antara antigen streptokokus dengan antibodi (IgG) yang mengendap pada ginjal, akan mengaktivasi komplemen sehingga terjadi inflamasi akut. Juga terjadinya antibodi setelah infeksi streptokokus grup tertentu dapat bereaksi silang dengan otot jantung karena pada otot jantung terdapat susunan yang mirip dengan antigen bakteri streptokokus, sehingga menyebabkan kerusakan otot jantung (Rheumatic Heart Disease)(Hokama and Namura,1982).

### **3. OBAT-OBAT ANTIINFLAMASI**

Obat-obat antiinflamasi mempunyai aktifitas menekan fungsi sel-sel inflamasi non spesifik dan menekan respon imun. Obat-obat antiinflamasi yang ada dibedakan menjadi :



## 1. Kortikosteroid

Merupakan obat yang sangat kuat dan menjadi standar untuk pengobatan penyakit-penyakit inflamasi. Efek antiinflamasinya adalah menekan terjadinya marginasi, migrasi dan akumulasi netrofil di daerah inflamasi, serta menekan aktivitas sel yang terlibat dalam respon inflamasi, menghambat fagositosis oleh netrofil dan monosit, menghambat produksi sitokin inflamatori seperti IL-1 dan TNF- $\alpha$  (Stites & Terr,1991)

## 2. Non steroid

Selain sebagai antiinflamasi juga sebagai analgesik dengan menghambat produksi Prostaglandin, melalui jalur siklooksigenasi, yang mempengaruhi vasodilatasi, edema dan agregasi trombosit. Disamping itu obat-obat antiinflamasi non steroid juga menstimulasi sel T supresor(Stites & Terr,1991).

Penelitian modern pada kondisi patofisiologi proses inflamasi difokuskan pada struktur kimia baru dari bahan alam dan interaksinya pada target yang berbeda seperti pada reseptor dan enzim(Olsson.1993). Pengembangan sumber-sumber senyawa baru dari bahan alam yang mempunyai aktivitas antiinflamasi didasarkan pada penggunaannya dalam pengobatan tradisional(mizukoshi.1994).

*Abrus precatorius* L. yang biasa digunakan di Cina untuk pengobatan laringitis, hepatitis dan bronkitis, diindikasikan mempunyai aktivitas antiinflamasi. Abruquinon, suatu senyawa isoflavanquinon yang diisolasi dari tanaman ini, menunjukkan aktivitasnya sebagai antiplatelet, antiinflamasi dan antialergi, melalui penghambatan agregasi platelet, penghambatan degranulasi netrofil dan menekan pelepasan enzim lisosom dari netrofil(Kuo.1995).



Dua senyawa derivat quercetin yang diisolasi dari *Erythrospermum monticolum* mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi yang didasarkan pada kemampuannya menghambat edema (Carmen Recio.1995). Gene dkk juga menunjukkan bahwa fraksi butanol dari ekstrak batang *Baccharis trimera* (Less). yang mengandung rutin dan saponin mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi dan analgesik, yang tampaknya bekerja melalui penghambatan pada produksi Prostaglandin(gene.1996).

#### 4. FLAVONOID

Sampai saat ini, lebih dari 4000 flavonoid telah diidentifikasi dalam tumbuhan vaskular, dan tampaknya ini hanya sebagian dari jumlah total yang ada di alam, sebab baru beberapa prosen spesies tumbuhan yang sudah diteliti flavonoidnya(Harborne,1988).

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau. Sejumlah tanaman obat, termasuk berbagai tumbuhan yang digunakan pada pengobatan alamiah, menggunakan kandungan flavonoidnya(Markham,1988). Dalam "Pharmazeutische Biologic" dikatakan bahwa setengah dari obat-obatan yang mengandung flavonoid yang berhasil menyembuhkan, telah digunakan dalam pengobatan tradisional (Sencider,1977).

Aktivitas biokimia beberapa flavonoid dan metabolitnya tergantung terutama pada struktur dan orientasi relatif dari bermacam-macam bagian pada molekul. Karena untuk mengetahui mekanismenya pada berbagai sistem seluler dan enzim, diperlukan pengetahuan mengenai sifat-sifat molekulernya(Wollenweber, 1988)..

Studi mengenai struktur flavonoid telah menunjukkan bahwa satu jenis flavonoid dapat memberikan lebih dari satu respon, tergantung pada titik tangkap enzimnya, sehingga dengan adanya penyebaran efek tersebut, dapat mendukung flavonoid sebagai zat terapeutik baru untuk pengobatan penyakit. Reaktivitas kimianya

yang tinggi ditunjukkan pada afinitas ikatannya pada polimer biologi, sebaik kemampuannya untuk mengkatalisis transpor elektron (Cody, 1988). Disamping itu flavonoid telah diketahui sebagai senyawa antiinflamasi dan antialergi, yang mungkin berinteraksi dengan sel-sel imunokompeten dan menghambat mekanisme imun yang terlibat dalam patogenesis respon inflamasi akut (Berg, 1988).

#### 4.1. Aktivitas Flavonoid pada Sistem Imun

Pada tahun 1936, Szent-Gyorgy mengemukakan bahwa flavonoid mempunyai aktivitas antiinflamasi dan anti alergi. Aktivitasnya melalui interaksi dengan sel-sel imunokompeten dan penghambatan pada mekanisme imun yang terlibat dalam patogenesis reaksi inflamasi akut. Interaksi ini terjadi pada respon imun baik spesifik maupun non spesifik.

Quercetin, hesperitin, kalkon, apigenin, fisetin, catekin(cianidanol), rutin taksifolin dan tangeretin dapat menekan pelepasan oksidan oleh netrofil. Senyawa oksidan ini bersama-sama dengan faktor yang dilepas oleh netrofil dan makrofag dapat menyebabkan inflamasi dan kerusakan jaringan. Penekanan sistem ini kemungkinan disebabkan karena adanya penghambatan pada influks Kalsium dan penghambatan jalur 5-lipooksigenase dari metabolisme asam arakidonat(Berg and Daniel.1988)

Percobaan in vitro menunjukkan bahwa flavonoid merupakan *radical scavenger* yang baik. Melalui aktivitas ini, flavonoid baik langsung atau tidak langsung dapat mengatur proliferasi limfosit T. Disamping itu flavonoid dapat mempengaruhi makrofag dan menghambat pembentukan oksigen radikal sehingga menurunkan sitotoksitas sel(Pignol.1988).

Beberapa flavonoid seperti quercetin, katekin dan  $\beta$ -hidroksietil-rutosida mempunyai efek menghambat fungsi platelet dan aktivasi leukosit dan mampu

melindungi sel-sel endotel sehingga dapat menghambat timbulnya arterosklerosis (Beretz and Cazenave.1988).

#### 4.2. Analisa Kuantitatif

Flavonoid tersebar luas dan biasanya berada dalam bentuk glikosidanya, tetapi sangat sulit untuk menentukan kandungan glikosidanya dalam ekstrak tanaman. Hidrolisa glikosida dan deteksi spektrofotometrinya sebagai kompleks kelat Aluminium klorida merupakan metode yang banyak digunakan untuk menentukan kandungan flavonoidnya. Metode yang tercantum dalam Pharmacopoeia Swiss VII dan Pharmacopoeia German X ini tidak terlalu spesifik karena hanya mengukur flavonoid total yang dapat dihidrolisa dengan asam, sedangkan C-glikosida flavonoid tidak dapat dihitung. Untuk mengatasi hal ini, digunakan metode kuantitatif dengan reversed-phase HPLC yang didasarkan pada reduksi kompleks glikosida flavonoid menjadi bentuk aglikonnya (Hesler & Sticher, 1990).

#### 5. UJI BIOAKTIVITAS

Di dalam tubuh terdapat sel-sel dan molekul-molekul yang dikelompokkan dalam sistem imun dan berfungsi sebagai keseimbangan, perondaan dan pertahanan tubuh terhadap mikroba patogen dan bahan-bahan asing yang masuk ke dalam tubuh. Tanggapan yang diberikan oleh sistem ini dinamakan respon imun. Rangsangan pada sistem imun non-spesifik menimbulkan stimulasi fungsi dan efisiensi granulosit, makrofag, sel Kupffer, monosit, sel natural killer, faktor komplemen dan populasi T-limfosit tertentu. Rangsangan ini juga termasuk rangsangan pada mediator seperti monokin dan limfokin yang disekresi sel-sel tersebut sebagai respon dari adanya induksi. Sejauh sel imun dan mediatornya terlibat langsung dalam proses antigen , pemindahan mikroorganisme dengan fagositosis, lisis bakteri, virus atau sel tumor,

sistem uji yang digunakan harus mengandung sel target atau faktor yang dirangsang. Sehingga menjadi jelas mengapa granulosit, monosit, makrofag dan limfosit T adalah sel target yang digunakan untuk uji skrining respon imun. Sel-sel ini dapat diperoleh dari darah donor manusia atau organ hewan (Dey, 1991).

### 5.1. Pengujian terhadap fungsi fagositosis sel-sel inflamasi

Sel-sel fagosit adalah kelompok sel yang berfungsi melakukan fagositosis terhadap benda asing yang menginvasi tubuh. Secara umum sel-sel fagosit dibagi dalam dua grup, yaitu sel fagosit mononuklear (Mononuclear Phagocytosis) dan granulosit. Sel fagosit mononuklear yang terdapat di dalam sirkulasi darah disebut monosit dan yang berada dalam jaringan atau organ dinamakan makrofag.

Sel-sel granulosit dikenal juga sebagai sel-sel inflamasi karena memegang peranan dalam proses inflamasi. Fungsi utama dari sel granulosit adalah memfagosit mikroba atau makromolekul asing yang masuk tubuh. Yang termasuk dalam sel-sel granulosit adalah **neutrofil** yang disebut juga polimorphonuklear leukosit yang memberikan respon yang sangat cepat terhadap rangsangan kemotaktik, fagositosis dan penghancuran partikel asing. **Eosinofil**, dengan fungsi utamanya adalah pertahanan terhadap agen-agen infeksi. Dan **basofil**, merupakan pasangan yang tersirkulasi dari sel mast jaringan (Abbas, 1994).

Berbagai macam teknik telah dikembangkan untuk menguji fungsi dari sel-sel fagosit baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Secara *in vitro* terutama didasarkan pada pengukuran kemampuan menelan (*ingesti*) mikroorganisme opsonisasi atau partikelasing. Mikroorganisme yang sering digunakan dalam pengujian ini, diantaranya *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Prosentase fagositosis dapat menghasilkan angka stimulasi atau supresi, yang dihitung dengan cara menghitung indeks fagositosisnya (Wagner, 1991).

## 5.2. Pengujian kemoluminesen

Kemoluminesen (CL) terjadi sebagai konsekuensi fagositosis bakteri atau partikel inert oleh leukosit. Setelah opsonisasi, bakteri dapat dibunuh oleh spesies oksigen seperti  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$  dan OH. Seberkas sinar digabungkan dengan pelepasan spesies yang teroksidasi yang dikombinasi dengan myeloperoksidase. Sinar yang dihasilkan dapat diperkuat dengan penambahan luminol atau lucigenin untuk menghasilkan kemoluminesen selama fagositosis. Proses fagositosis in vitro dapat diikuti dengan memonitor emisi cahaya menggunakan luminometer selama 1 -2 jam. Zymosan, campuran polisakarida yang diperoleh dari ragi (*Saccharomyces cereviceae*) dengan penghancuran dinding sel, digunakan sebagai "challenge" (Dey.1991).

## 5.3. Pengujian Kemotaksis

Pertahanan host yang optimal terhadap infeksi diartikan sebagai kapasitas leukosit yang tinggi untuk merespon dengan kemotaksis dan migrasi acak. Seringkali infeksi kronik atau lanjutan, kanker, dermatitis atopik, rheumatoid arthritis dan diabetes berhubungan dengan kemotaksis in vitro. Karena itu, senyawa yang meningkatkan atau merangsang pergerakan leukosit menjadi pusat perhatian. Kemotaksis diawali dengan migrasi sel fagosit (PMN, monosit dan makrofag) sebagai respon rangsangan kemotaktik, yang menyebabkan perpindahan ke arah pusat konsentrasi atraktan.

Sumber faktor kemotaktik yang paling penting adalah sistem komplemen, dari subfaktor C5a. Proses Kemotaktik dari komplemen melalui jalur klasik maupun jalur alternatif dapat mengaktifkan migrasi sel fagosit ke semua mikroorganisme. Kerjasama produk-produk C5b, C6, C7 dan produk dari metabolisme asam arakidonat melalui jalur lipooksigenase dan siklooksigenase juga mempunyai aktivitas kemotaktik. Faktor-

faktor kemotaktik termasuk juga produk-produk yang dihasilkan oleh sel-sel limfosit, monosit dan PMN.

Uji *in vitro* digunakan untuk menentukan seberapa jauh leukosit dapat merespon rangsangan kemotaktik dan seringkali dilakukan pada netrofil, monosit dapat juga digunakan, tetapi basofil dan eosinofil tidak mempunyai relevansi klinik.

Dua teknik kuantitatif yang berbeda untuk uji kemotaktik leukosit *in vitro* adalah metoda saringan mikrofor dan teknik agarosa. Pada metoda saringan mikrofor, sel yang ditempatkan pada saringan dibiarkan bermigrasi melalui lubang-lubang saringan. Jumlah sel yang bermigrasi atau jarak migrasi dianalisa. Pada metoda agarosa, sel yang ditempatkan di tengah sumuran dibiarkan bermigrasi dalam agarosa menuju ke arah kemoatraktan. Jarak migrasi dapat digunakan untuk menunjukkan respon (Dey, 1991).

#### **5.4. Pengujian Proliferasi Limfosit**

Limfosit menunjukkan suatu populasi sel dengan sifat imunologi yang berbeda; suatu sel fungsional yang merupakan mediator respon primer, prekursor prefungsional, sel memori dan sel yang aktif secara imunologi. Dapat dibedakan menjadi Limfosit T dan Limfosit B. Limfosit T dapat dibedakan lagi menjadi sel helper, supresor, sitotoksik dan memori.

Fungsi limfosit dapat diketahui dengan mengukur kemampuan limfosit berproliferasi, memproduksi mediator, menginduksi respon sitotoksik dan mengatur respon imun. Stimulasi proliferasi limfosit mempunyai relevansi klinik pada pasien dengan depresi imunitas seluler, penyakit otoimun dan infeksi bakteri atau virus seperti halnya pada kanker. Stimulasi populasi limfosit juga mempunyai efek potensiasi pada sistem imunokompeten yang lain. Proliferasi limfosit dapat dihitung dengan penentuan peningkatan sintesis DNA karena respon pada suatu mitogen (fitohemaglutinin/PHA),

mitogen pokeweed (PWM) dan Concanavalin A (Con A) atau stimulator lain yang sesuai dengan limfosit yang diinkubasi dalam media yang mengandung prekursor DNA yang dilabel radioaktif (timidin). Jumlah radioaktivitas dalam sel ditentukan dengan skintilasi.

Untuk skrining sederhana, uji ini dilakukan menggunakan limfosit darah tepi manusia atau subpopulasi limfosit individu, meskipun prinsipnya juga bisa menggunakan limfosit dari sumber-sumber lainnya. Kondisi optimal masing-masing sel tersebut harus ditetapkan (Dey, 1991).

### **5.5. Pengujian Aktivitas Sel Natural Killer (NK)**

Sel NK merupakan sel efektor dengan sitotoksitas spontan (sitolisis atau sitostasis) melawan berbagai macam sel target, seperti sel malignan atau sel normal yang terinfeksi virus, jamur dan parasit. Efek sitotoksik adalah mekanisme respon imun yang utama melawan penyebaran sel tumor metastase dan pertahanan natural melawan tumor.

Sel NK mempunyai peranan yang penting, berkaitan erat dengan subpopulasi limfosit, yang terlihat sebagai limfosit granular, yang termasuk kurang lebih 3 % sel mononuklear dan 5% limfosit darah tepi. Sel-sel tersebut bersifat non-fagosit, non-adheren dan mampu berikatan dengan sel target yang dilapisi antibodi dan diperantarai ADCC kecuali sel natural yang diperantarai sitotoksik. Beraksi sebagai antigen bebas dan termasuk di dalam sistem imun nonspesifik. Semua sel dapat diaktivasi dengan interferon dan IL-2. Herbermann membedakan antara lima tahap utama dalam interaksi antara sel efektor dan sel target yang menunjukkan sitotoksitas. Pengenalan sel target oleh sel efektor, menikat pada sel target, mengaktifkan mesin litik, efek litik pada sel target dan pelarutannya. Respon in vitro sel efektor dan sel target dapat diukur dengan bermacam-macam teknik. Teknik pelepasan  $^{51}\text{Cr}$  seringkali digunakan untuk menguji



imunitas yang diperantarai sel, dimana komponen intraseluler sel target dilabel dengan  $^{51}\text{Cr}$  dan sitolisis setelah penambahan sel NK ditentukan oleh pelepasan label dari sel target.

Ber macam-macam sel target yang biasanya paling sensitif (K-562 dari pasien leukemia myelogenous kronik atau YAC-1 limfoma sel T tikus) dapat digunakan. Sumber sel efektor pada sistem hewan adalah limfe. Dari darah manusia, sel mononuklear darah tepi biasa digunakan dan prosedur ujinya sebagai berikut :

Sel target ( $3 \times 10^6$  dalam 0,5 ml media RPMI-1640) dilabel dengan 250 uCi  $^{51}\text{Cr}$  selama 60 menit. Sel tersebut dicuci dengan media uji dan dibuat konsentrasi  $2 \times 10^5$  sel/ml. sel target tersebut dicampur dengan sel efektor dengan perbandingan 100 : 1 sampai 1:1 dalam mikrotiter 96 dasar V ( sel spleen dilapis pada syring wool nilon, leukosit mononuklear dipisahkan dengan sentrifugasi pada Ficoll-Hypaque). sumuran tripel dengan hanya sel target dan dengan sel target ditambah 0,25 % Triton X-100 disiapkan segera. Plate diinkubasi selama 4 jam pada  $37^\circ\text{C}$  dan  $\text{CO}_2$  5%.kemudian disentrifus selama 5 menit pada 250xg. 100 ul supernatan dihitung dengan gamma counter.

Persentase pelepasan  $^{51}\text{Cr}$  dihitung dengan rumus :

$$(E-S)/(T-S) \times 100$$

E =  $^{51}\text{Cr}$  yang dilepaskan dari sel target dengan adanya sel efektor.

S = pelepasan dari sel target

T = pelepasan total dari sel target dengan adanya Triton X-100

Sitotoksisitas sel yang diperantarai yang tergantung antibodi (ADCC) juga bisa diuji dengan cara yang sama. Perbedaannya adalah pada penggunaan sel target yang disalut dengan Ig G. Persentase ADCC dihitung dengan membandingkan persentase sitotoksisitas dengan sel target yang tidak disalut dengan antibodi dan sel target yang disalut dengan antibodi (Dey, 1991).

### 5.6. Pengujian terhadap sekresi TNF- $\alpha$

TNF (Tumor Necrosis Factor) dulu dikenal dengan nama Limfotoksin. Sumber utama TNF adalah sel fagosit mononuklear yang diaktivasi dengan lipopolisakarida (LPS, sumber yang lain adalah sel T yang dirangsang antigen, sel NK aktif dan sel mast aktif. Kerja biologis TNF meliputi :

- a. TNF menyebabkan sel-sel endotel vaskular mengekspresikan reseptor permukaannya yang baru sehingga mengakibatkan sel permukaan endotelial menjadi adhesif terhadap leukosit, terutama terhadap neutrofil, monosit dan limfosit. Hal ini mendukung terjadinya penumpukan sel-sel leukosit di tempat terjadinya inflamasi.
- b. TNF sangat poten untuk mengaktivasi sel-sel neutrofil, tetapi juga berefek terhadap eosinofil dan sel fagosit mononuklear.
- c. TNF merangsang sel-sel fagosit mononuklear dan sel-sel tipe lain untuk memproduksi sitokin seperti IL-1, IL-6, TNF sendiri dan kemokin.
- d. TNF dapat bertindak seperti Interferon dalam melakukan proteksi terhadap infeksi virus dan meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I, serta meningkatkan kemampuan lisis CTL (Abbas, 1994).

Pengujian terhadap TNF dimaksudkan untuk menguji fungsi sel-sel monosit sirkulasi atau makrofag jaringan. 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) atau ELISA (Hudson, 1989).

### 5.7. Pengujian terhadap Komplemen.

Meskipun sistem komplemen merupakan sistem imun humoral non spesifik yang berperan penting dalam memproses antigen, penelitian lebih lanjut menunjukkan keterlibatannya pada proses inflamasi.

Sistem komplemen adalah jalur efektor yang penting dari respon imun humoral non-spesifik. Komplemen terdiri dari protein serum multipel, yang secara normal ada dalam darah dalam bentuk inaktif, yang berinteraksi sebagian. Reaksi *cascade-like* ini mengandung 4 segmen - dua jalur untuk pengenalan dan aktivasi, jalur klasik dan alternatif, reaksi percepatan dan fase efektor singel. Pada mulanya aktivasi dipicu oleh kompleks antigen-antibodi, yang berikutnya diaktivasi oleh senyawa-senyawa lain termasuk bakteri, jamur dan polisakarida tanaman. Bagian proteolitik komponen komplemen menunjukkan aktivitas biologi(khususnya C3a dan C5a) dan akhirnya merusak sel, yang disebabkan adanya kompleks C5b9. Pelepasan mediator peptida menyebabkan beberapa aktivitas biologi seperti peningkatan permeabilitas vaskular lokal, penarikan leukosit dan pengaturan produksi antibodi. Oleh karena itu sistem komplemen terlibat dalam proses inflamasi dan reaksi pertahanan imunologis.

Metode yang sesuai untuk mengetahui interaksi senyawa-senyawa dengan komplemen pada kedua jalur tersebut adalah uji hemolitik *in vitro*. Yang didasarkan pada hemolisis sel darah merah oleh adanya kompleks membran setelah aktivasi komplemen. Kecepatan perubahan hemolisis dibandingkan dengan kontrol ditentukan dengan spektrofotometri. Pengaruh pada jalur klasik dilakukan dengan menggunakan sel darah merah domba yang disensitisasi sebagai kompleks antigen-antibodi. Uji untuk jalur alternatif menggunakan sel darah merah kelinci sebagai aktivator dan sistem hemolitik(Dey,1991).

**a. Uji hemolitik jalur klasik**

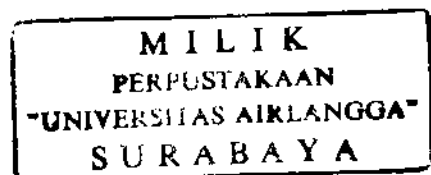
Dua ratus  $\mu$ l larutan senyawa (dengan dosis 0.01 - 1 mg/ml atau  $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M), 1000  $\mu$ l larutan komplemen dan 100  $\mu$ l sel darah merah domba tersensitisasi ( $2,5 \times 10^8$  sel/ml) diinkubasi pada  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit. Serum dari donor (diencerkan dengan NHS 1:200 - 1:300) atau dari hewan coba (diencerkan dengan GP 1:700 - 1:900). Reaksi dihentikan dalam es dan disentrifus ( $480 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 menit). Absorbansi dari supernatan diukur pada panjang gelombang 412 nm. Dibandingkan dengan buffer Salin-veronal sebagai kontrol, penurunan jumlah hemolisis menunjukkan persentase interaksi senyawa-senyawa dengan komplemen (Dey.1991; Miller.1974).

**b. Uji hemolitik jalur alternatif**

Dua ratus  $\mu$ l larutan senyawa (dengan dosis yang sama), 1000  $\mu$ l larutan komplemen (dalam NHS 1:16) dan 100  $\mu$ l sel darah merah kelinci ( $1,0 \times 10^8$  sel/ml) diinkubasi pada  $37^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit. Kemudian dilanjutkan dengan prosedur yang sama diatas. Untuk menghambat reaksi jalur klasik digunakan bufer EGTA yang mengandung  $\text{Mg}^{2+}$ .

Sistem uji dapat menunjukkan penghitungan efek senyawa pada komponen komplemen khususnya komponen C1 atau C3. Untuk menentukan mekanisme aksi, lebih jauh lagi analisa komponen hemolitik atau elektroforesis imunofiksasi. Metoda-metoda ini menunjukkan perbedaan antara penghambatan dan aktivasi. Penghambatan komponen komplemen sama dengan kebutuhan komplemen yang disebabkan karena aktivasi komponen pada kedua jalur yang menunjukkan penurunan hemolitik.

Bila ekstrak tanaman digunakan untuk skrining, klorofil dan tanin harus dihilangkan sebelum uji karena mempengaruhi hemolisis. Karena itu hasil positif yang didapatkan harus diperhitungkan dengan hal tersebut.



Meskipun banyak senyawa yang berinteraksi dengan komplemen secara *in vitro*, hanya beberapa yang efektif secara *in vivo*. Disamping toksisitasnya, beberapa obat aktif gagal mencapai konsentrasi yang diijinkan secara *in vivo* (Dey, 1991; Platt-Mills and Ishizaka, 1974).

### 5.8. Pengujian terhadap pembentukan antibodi primer Ig M

Respon antibodi primer dan sekunder dapat dibedakan secara kualitatif maupun kuantitatif dalam berbagai aspeknya.

- a. Respon antibodi primer dihasilkan oleh rangsangan terhadap sel-sel B yang belum pernah terangsang sama sekali, sedangkan respon sekunder berasal dari klon-klon sel B yang telah berubah bentuk dan terhadap sel-sel memori. Oleh karena itu respon sekunder terbentuk lebih cepat dibandingkan respon primer, dan jumlah antibodi yang diproduksi juga jauh lebih besar.
- b. Pada respon antibodi primer, kelas antibodi yang dominan adalah kelas IgM, karena sel B "resting" mensekresi molekul IgM. Sedangkan pada respon sekunder, antibodi yang terbentuk terutama adalah IgG.
- c. Afinitas rata-rata antibodi spesifik yang diproduksi dalam respon sekunder, lebih tinggi daripada dalam respon primer. Hal ini yang dinamakan "affinity maturation", yang merupakan hasil dari maturasi somatik di dalam Imunoglobulin dan aktivasi selektif oleh antigen yang terikat pada molekul Imunoglobulin di permukaan sel B.

Pengujian terhadap respon imun humoral spesifik, ditujukan terhadap respon sel B dalam memberikan tanggapan terhadap rangsangan antigen. Pengujian terhadap produksi antibodi dapat diamati berdasarkan pada jumlah antibodi yang terbentuk yang telah beredar di dalam sirkulasi. Melalui sampel serum, dapat diuji titer antibodi primer (IgM) dan titer antibodi sekunder (IgG), dengan menggunakan metoda serologi yang sesuai dan sensitivitas yang diinginkan (Dey, 1991; Hyde, 1987).

## 6. SISTEM IMUNITAS MENCIT

Digunakannya mencit sebagai hewan coba karena 60-80 % uji biologik menggunakan hewan coba mencit, terutama dari jenis "outbred", dengan alasan (Hume,1972):

- a. Tubuh kecil sehingga tidak banyak memerlukan ruang pemeliharaan dan konsumsi makanan.
- b. Mudah beradaptasi dengan kandang dan lingkungan sekitar.
- c. Harganya murah
- d. Sistem imun mencit lebih banyak diketahui dibandingkan dengan sistem imun hewan coba yang lain.

Pada tahun 1966, Claman dkk. menemukan konsep seluler untuk membedakan subpopulasi sel T pada mencit, dan sejak itu pula mencit digunakan sebagai model untuk meneliti sistem imun seluler manusia (Claman,1983).

Antigen permukaan sel limfosit mencit yang pertama kali ditemukan adalah antigen "theta" yang kemudian dikenal dengan nama Thy-1. Antigen ini hanya terdapat pada sel T, tidak pada sel B. Sedangkan antigen yang terdapat pada semua sel limfosit mencit adalah LY, dimana Lyt pada sel T dan Lyb pada sel B. Antigen inilah yang digunakan untuk membedakan subpopulasi limfosit mencit.

## BAB 3

### HIPOTESIS PENELITIAN

#### 1. LANDASAN TEORI

- A. Daun Ungu secara tradisional banyak digunakan untuk menyembuhkan bengkak, bisul dan bawasir(Heyne.1987). Ozaki dkk telah membuktikan aktivitas antiinflamasi dari Daun Ungu(Ozaki.1989).
- B. Inflamasi adalah reaksi tubuh terhadap masuknya benda asing, invasi mikroorganisme atau kerusakan jaringan. Terjadinya reaksi inflamasi dimaksudkan untuk melokalisir infeksi dan memudahkan eliminasi patogen. Prosesnya meliputi suatu seri peristiwa kompleks yang terdiri dari vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, eksudasi cairan dan migrasi leukosit, penumpukan leukosit dan selanjutnya adalah aktivasi leukosit untuk mensekresi metabolit oksigen aktif.(Im lee.1995).
- C. Respon inflamasi ditunjukkan dengan adanya migrasi sel-sel inflamasi, fagositosis oleh sel-sel inflamasi dan keluarnya mediator inflamasi serta timbulnya respon imun /antibodi(Stites and Terr.1991).
- D. Respon inflamasi yang tidak terkendali menimbulkan penyakit-penyakit yang serius seperti rheumatoid arthritis, pulmonaris fibrosis, psoriasis yang harus diterapi dengan antiinflamasi(Bellanti.1993).
- E. Aktivitas dari obat-obat antiinflamasi yang banyak digunakan dapat diketahui dari kemampuan penghambatan pada fungsi fagositosis, pada sekresi mediator inflamasi dan pada timbulnya respon imun/pembentukan Imunoglobulin (Bellanti.1993).

- F. Flavonoid mempunyai aktivitas antiinflamasi melalui interaksi dengan sel-sel imunokompeten dan penghambatan pada mekanisme imun yang terlibat dalam patogenesis reaksi inflamasi akut. Interaksi ini terjadi pada respon imun baik spesifik maupun non spesifik (Berg and Daniel, 1988).

## **2. HIPOTESA PENELITIAN**

Berdasarkan landasan teori dan kerangka konseptual di atas, maka hipotesis penelitian adalah :

**Pemberian peroral ekstrak etanol Daun Ungu pada mencit dapat :**

- a. menekan fungsi fagositosis**
- b. menghambat pembentukan IgM**
- c. menghambat sekresi TNF- $\alpha$**



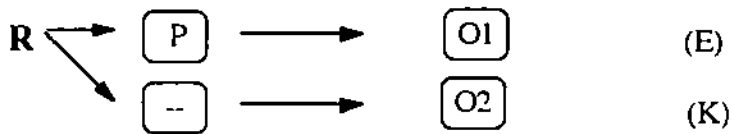
## BAB 4

### METODA PENELITIAN

#### 1. RANCANG BANGUN PENELITIAN

Rancang bangun penelitian adalah Penelitian **Eksperimental** **sesungguhnya**, dengan menggunakan rancangan :

#### THE POSTTEST- ONLY CONTROL GROUP DESIGN



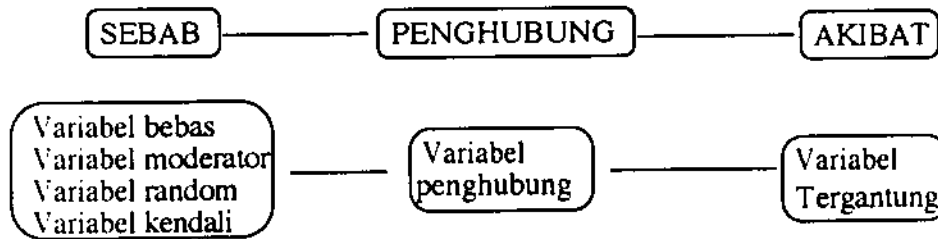
Keterangan :

- (E) : Kelompok eksperimen dengan perlakuan
- (K) : Kelompok kontrol
- P : Perlakuan yaitu pemberian per-oral ekstrak etanol daun ungu
- O1 : Observasi sesudah perlakuan
- O2 : Observasi pada kontrol
- R : Randomisasi mencit dalam kelompok eksperimen dan kontrol ditentukan dan dipilih secara random

Dipilihnya rancangan penelitian “ The posttest-only control group design” dengan asumsi bahwa tiap unit dalam populasi adalah homogen, artinya semua karakteristik antar unit populasi adalah sama. Maka pengukuran awal tidak dilakukan, karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi.

## 2. VARIABEL PENELITIAN

Skema hubungan antar variabel



Variabel bebas : pemberian per-oral ekstrak etanol daun ungu

Variabel moderator : bentuk sediaan ekstrak daun ungu

Variabel random : berat badan dan jenis kelamin mencit

Variabel kendali : spesies mencit, makanan, minuman, kandang hewan, metoda pengukuran dan cara administrasi

Variabel penghubung : cara kerja daun ungu dalam mempengaruhi fungsi fagositosis, pembentukan IgM dan sekresi TNF- $\alpha$

Variabel tergantung : pengaruh pada mencit sebelum dan sesudah perlakuan

## 3. MATERI PENELITIAN

### a. Bahan uji

Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol dari serbuk kering daun *Graptophyllum pictum* (L.) Griff varietas lurido-sanguineum. Daun tersebut diperoleh dari Taman Materia Medika, Batu-Malang.

### b. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit mencit dewasa umur antara 1-2 bulan, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA), Wonocolo, Surabaya, dengan alasan : secara seksual mencit telah dewasa (Sexually mature) dan perubahan berat badan selama proses penelitian relatif kecil (Hume, 1972)

Teknik Pengambilan hewan coba digunakan metoda **“Simple Stratified Random Sampling”** dengan alasan : walaupun populasi mencit dalam kandang hewan pemeliharaan telah diusahakan dalam kondisi perawatan yang sama, seperti makanan dan minuman, situasi kandang, jenis dan spesies mencit, umur mencit sama, ternyata masih terdapat perbedaan dalam hal berat badan dan jenis kelamin (Hume, 1972). Perbedaan berat badan dan jenis kelamin mencit setara dengan perbedaan jumlah sel-sel imunokompeten di dalam tubuhnya, misalnya jumlah total limfosit (Schalm, 1975).

Jumlah hewan coba dihitung dengan menggunakan rumus dari Steel & Torrie:

$$n = \frac{(z\alpha + z\beta)^2 \cdot QD^2}{d^2}$$

Keterangan :

n = jumlah hewan coba dalam masing-masing kelompok

z = nilai standar normal yang besarnya tergantung

bila  $\alpha = 0,05$  -----z = 1,96

$\beta$  = power test

QD2 D2 = 1, karena merupakan grup yang berpasangan

Berdasarkan tabel dari *Number of Observations for t-test of difference between two means* dengan  $\alpha = 0,05$  jumlah hewan coba masing-masing kelompok = 8

### c. Reagens

Bahan kimia yang digunakan adalah dari produk Sigma dan E.Merck.

### d. Alat-alat

1. Buchi Rotavapor R-114
2. Double Wavelength Double Beam Spectrofotometer Hitachi 556/557
3. HPLC Perkin Ellmer dengan kolom 125/8/4 Nucleosil 120-5 C8
4. Refrigerated centrifuge
5. Mikroskop cahaya
6. Hemositometer
7. ELISA

## 4. INSTRUMEN PENELITIAN, PROSEDUR KERJA DAN TEKNIK

### ANALISA DATA

#### 4.1. Persiapan sampel penelitian

##### 4.1.1. Pembuatan Ekstrak Bahan

Daun *Graptophyllum pictum* (L).Griff. dikeringkan (tidak dengan sinar matahari langsung). Daun kering tersebut diserbuk menggunakan mesin penggiling.

Serbuk daun kering diekstraksi dengan etanol 95 % dengan cara digesti (dimaserasi dengan pemanasan 45<sup>o</sup> C) selama 3 x 24 jam (List,1989). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan penurunan tekanan sampai didapat ekstrak etanol kering.

##### 4.1.2. Penetapan Kadar Flavonoid Total

###### a. Pembuatan larutan induk

20 mg ekstrak ditambah dengan 2 ml HCl 25%, 1 ml HMT 5% dan aseton 20 ml. direfluks selama 15 menit. Campuran disaring dengan kapas dan ditambah aseton

sampai 100,0 ml. Diambil 20,0 ml campuran, ditambah dengan 20 ml air dan diekstraksi kocok dengan 2x 15 ml Etil asetat. Fase Etil Asetat dicampur dan ditambah dengan Etil asetat sampai 50,0 ml.

b. Pembuatan larutan standar

Diambil 10,0 ml larutan induk ditambah dengan larutan Asam Asetat 5% dalam metanol sampai 25,0 ml.

c. Pembuatan larutan sampel

Diambil 10,0 ml larutan induk ditambah 1 ml larutan  $AlCl_3$  5% dalam Asam asetat 5% dan ditambah larutan Asam Asetat 5% sampai 25,0 ml

d. Pengukuran Absorbansi

Diukur pada panjang gelombang 425 nm

e. Perhitungan: 
$$\text{Kadar (\%)} = \frac{\text{Absorbansi} \times 1,25}{\text{berat ekstrak}}$$

#### 4.1.3. Pembuatan Profil Ekstrak Etanol Daun Ungu dengan HPLC

Penyiapan sampel :

1. 400 g ekstrak direfluks dengan 70 ml MeOH dan 10 ml HCl 25% selama 30 menit.
2. Disaring dengan saringan gelas G3 dan dilanjutkan dengan saringan kertas LS 14.
3. Supernatan dicuci dengan 100 ml MeOH. Campuran tersebut diuapkan sampai 80 ml, kemudian ditambah MeOH sampai 100,0 ml.
4. 5,0 ml campuran disaring dengan Sepak C18 dan ditambah dengan MeOH sampai 10,0 ml. 5,0 ul diinjeksikan ke dalam sistem HPLC

#### 4.1.4. Preparasi sediaan untuk pemberian peroral

Belum ada ketentuan baku mengenai dosis pemakaian tanaman obat untuk pengujian sebagai imunomodulator (Dey, 1991). Oleh karena itu, dosis yang digunakan mengacu pada dosis imunomodulator yaitu : 0,2 ml infus 10% (Maat. Disertasi. 1997).

Jadi untuk sediaan peroral, ekstrak etanol kering tersebut dibuat suspensi dalam 0,5 % CMC Na yang diperhitungkan setara dengan 0,2 ml infus 10%.

Diberikan secara peroral 0,2 ml dengan menggunakan semprit 1 ml dengan jarum nomor 18 G ujung tumpul selama 7 hari.

## 4.2. UJI BIOAKTIVITAS

### 4.2.1. Uji fagositosis sel-sel granulosit in vitro

#### a. Prinsip pengujian :

Menghitung derajat ingesti (pinositosis) terhadap ragi yang telah mengalami opsonisasi oleh sel fagosit.

#### b. Kriteria hasil

$$\text{Indeks Fagositosis} = \frac{\text{Jumlah ragi yang ditelan}}{\text{Jumlah sel granulosit yang diamati (200-300 sel)}}$$

#### c. Prosedur kerja :

##### 1. Persiapan granulosit

Darah dari kedua kelompok mencit diambil dari jantung, diendapkan dengan penambahan dextran (2:1), didiamkan selama 30 menit pada suhu 25° C. Putar diatas larutan Ficoll-Hypaque selama 20 menit pada 1500 g. Lapisan diatas sel darah merah diambil dengan pipet, dicuci dengan media RPMI 2 kali dan diresuspensi dengan kepadatan  $3 \times 10^6$  sel/ml.

##### 2. Persiapan suspensi ragi

Ragi roti disuspensikan ke dalam larutan salin, dipanaskan selama 30 menit di atas air mendidih, filter 2 kali dengan kasa steril. Dibuat kepadatan  $3,7 \times 10^7$  sel/ml.

### 3. Pengujian

200  $\mu$ l suspensi granulosit ditambah 200  $\mu$ l serum (diencerkan 1 : 10 dalam salin) dan 200  $\mu$ l suspensi ragi, larutan PBS sebagai kontrol. Diinkubasikan di atas penangas air pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 30 menit dengan terus digojog, terakhir tambahkan EDTA.

### 4. Pengamatan hasil

500  $\mu$ l dari campuran diatas difiksasi di atas gelas obyek, dicat dengan metode Pappenheim. Di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali, dihitung jumlah granulosit yang menelan sel ragi di antara 200-300 sel granulosit.

## 5.2.2. Respon antibodi primer (IgM)

### a. Prinsip pengujian :

Menentukan titer antibodi IgM dengan metode aglutinasi. Komponen sistem imun yang diuji adalah sel B, dan respon yang diuji adalah respon imun humoral spesifik.

### b. Kriteria hasil :

Titer antibodi IgM adalah besarnya pengenceran tertinggi dari serum yang masih memberikan reaksi aglutinasi.

### c. Prosedur kerja

1. Serum diambil dari darah jantung, 5 hari setelah dilakukan imunisasi dengan sel darah merah domba

2. Dibuat serial pengenceran dengan metode "Double dilution " dalam sumuran lempengan mikrotiter, volume 100  $\mu$ l.
3. Ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100  $\mu$ l sel darah merah domba dengan jumlah  $1 \times 10^8$  sel/ml.
4. Digoyang-goyang selama 5 menit, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada  $37^{\circ}$  C, dan selanjutnya didiamkan semalam pada suhu kamar.
5. Hasil aglutinasi dibaca di bawah kaca pembesar.

### **5.2.3. Pengujian Tumor Necrosis Factor (TNF)**

#### **a. Prinsip pengujian :**

Mengukur fungsi monosit dengan cara mengukur kadar  $\text{TNF}\alpha$  yang disekresi menggunakan metode ELISA. Komponen sistem imun yang diuji adalah monosit atau makrofag dan respon imun yang diuji adalah respon imun seluler non spesifik.

#### **b. Kriteria hasil :**

Kadar  $\text{TNF}\alpha$  ditentukan dengan cara membandingkan OD Unit kelompok tes dan kelompok kontrol

#### **c. Prosedur kerja :**

##### **1. Persiapan kultur monosit**

- a. Diambil darah mencit dari kedua kelompok melalui jantung sebanyak 0,5 ml, tambahkan larutan heparin dan encerkan dengan larutan dapar fosfat, sama volume.



- b. Lapiskan diatas larutan Ficoll-hypaque putar dalam sentrifus pada 2000 g selama 10 menit.
  - c. Pisahkan "buffy coat " yang terbentuk , dengan pipet, kemudian cuci dengan dapar fosfat sebanyak 3 kali.
  - d. Suspensikan ke dalam media RPMI 1640 yang mengandung 10 % bovine calf serum.
2. Lempengan mikrotiter dilapisi dengan monoklonal antibodi terhadap TNF $\alpha$ .
  3. Suspensi dari kultur monosit yang dirangsang dengan LPS ditambahkan dan diinkubasi.
  4. Ditambahkan anti TNF poliklonal yang berasal dari kelinci yang diikat dengan biotin.
  5. Ditambahkan konjugat yang terdiri dari antibodi-antibodi yang dilabel dengan fosfatase alkalin.
  6. Warna yang terbentuk setelah penambahan substrat, dibaca pada 405 nm

## 6. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober - Desember 1996 di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Laboratorium Hewan Coba Universitas Airlangga, Laboratorium Litbang Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Makmal Endokrin Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya.

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 1. Preparasi Sediaan Untuk Pemberiaan Per-oral

##### a. Pembuatan Ekstrak Bahan

Dari 500 gram serbuk daun kering diperoleh 51 gram ekstrak etanol kering.

##### b. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Kandungan flavonoid total hasil hidrolisa ekstrak etanol Daun Ungu yang dihitung sebagai hiperosida dengan menggunakan metoda spektrofotometri dari Farmakope Swiss VII dapat dilihat dari tabel berikut :

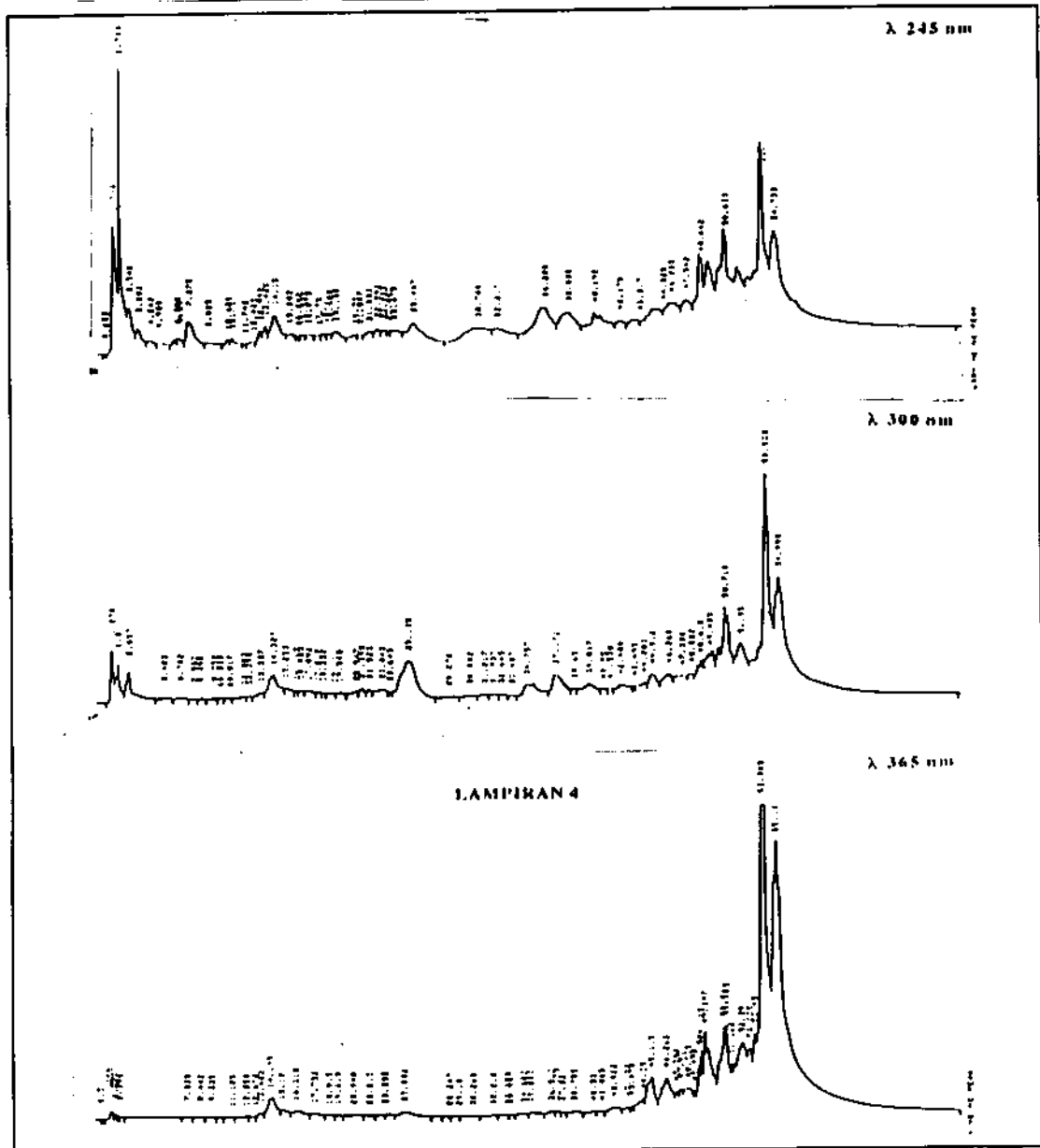
Tabel 5.1. Kadar flavonoid total ekstrak etanol Daun Ungu dengan metode spektrofotometri dari Farmakope Swiss VII

| Berat ekstrak (g) | Absorbansi | %    |
|-------------------|------------|------|
| 0,24              | 0,35       | 1,8  |
| 0,22              | 0,30       | 1,73 |
| 0,20              | 0,29       | 1,81 |
| 0,21              | 0,34       | 1,76 |
| 0,21              | 0,30       | 1,76 |
| 0,21              | 0,31       | 1,84 |

Jadi ekstrak etanol Daun Ungu yang digunakan mengandung 1,78% flavonoid total(SD = 0,04).

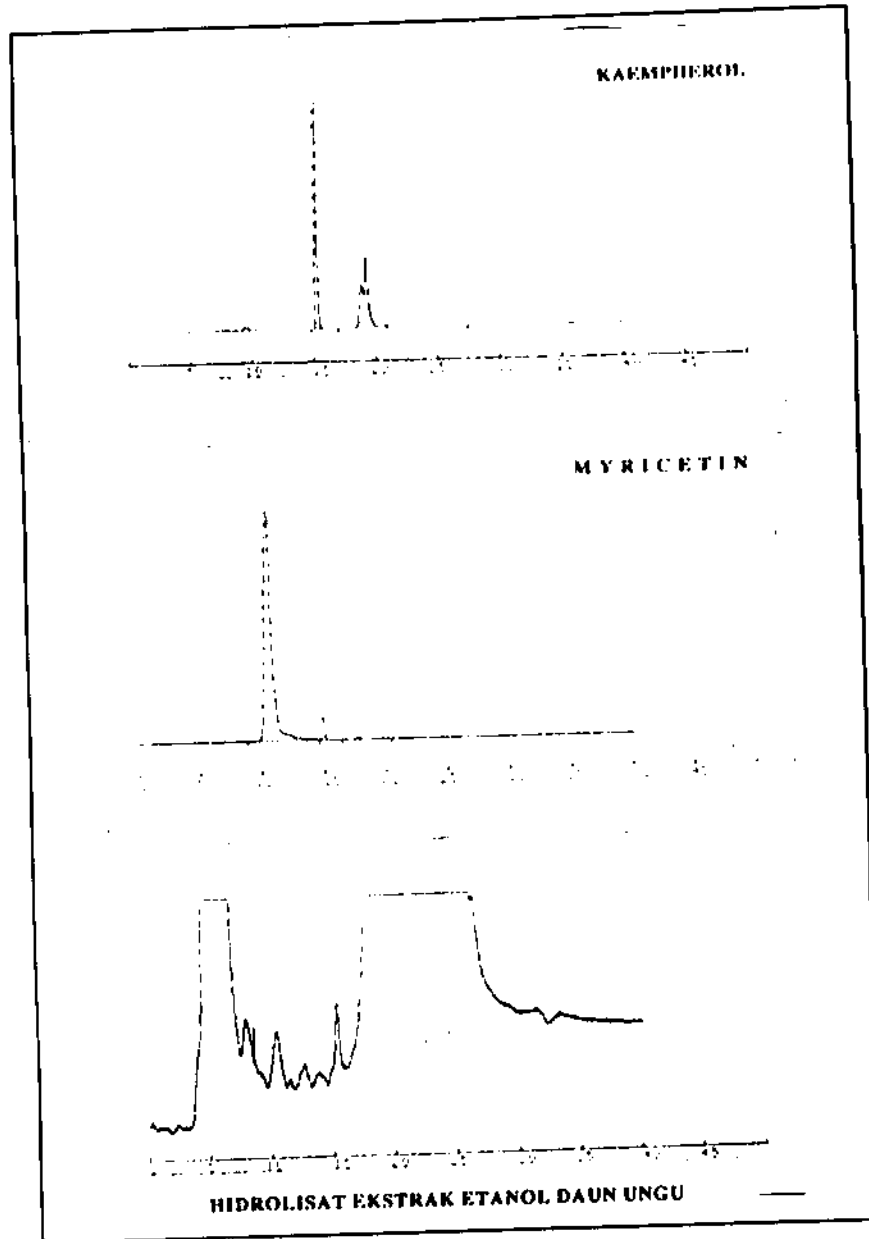
## c. Pembuatan profil kromatogram ekstrak etanol Daun Ungu dengan HPLC

### 1. Ekstrak Etanol Daun Ungu

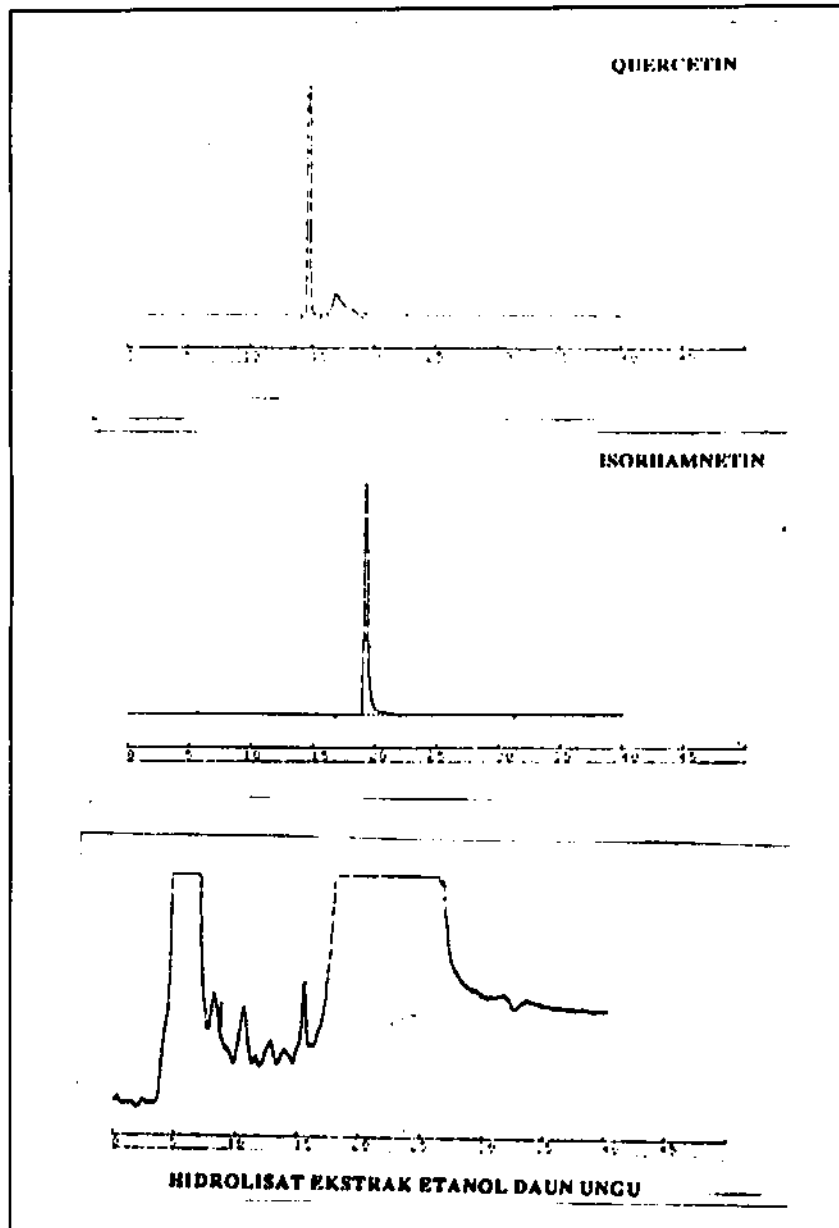


Gambar 5.1. Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Ungu dengan HPLC  
 Kolom : 125/8/4 Nucleosil 120 - 5 C8  
 Eluen : MeOH 10% - MeOH 100% selama 50 menit  
 Aliran 1 ml/menit; Injeksi 5 ul  
 Panjang gelombang 254 nm, 300 nm, 365 nm

## 2. Hasil Hidrolisa Ekstrak Etanol Daun Ungu



Gambar 5.2. Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Ungu dengan HPLC  
 Kolom : Art 720050. ET 125/8/4 Nucleosil 120 - 5 C  
 Eluen : MeOH 50% - MeOH 60% selama 10 menit  
 MeOH 60% - MeOH 100% selama 5 menit  
 Aliran 1 ml/menit  
 Injeksi 5 ul  
 Panjang gelombang 370 nm  
 Standar : Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin



Gambar 5.2. Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Daun Ungu dengan HPLC  
 Kolom : Art 720050. ET 125/8/4 Nucleosil 120 - 5 C  
 Eluen : MeOH 50% - MeOH 60% selama 10 menit  
 MeOH 60% - MeOH 100% selama 5 menit  
 Aliran 1 ml/menit  
 Injeksi 5  $\mu$ l  
 Panjang gelombang 370 nm  
 Standar : Quercetin, Isorhamnetin

Dari profil kromatogram hasil hidrolisa ekstrak etanol Daun Ungu terlihat adanya puncak-puncak yang sama dengan standar Kaempferol dan Myricetin.

#### **d. Preparasi Sediaan Per-oral**

Dosis sediaan yang digunakan adalah 0,2 ml suspensi ekstrak etanol 1,02% (setara dengan 0,2 ml infus 10%), per mencit dengan berat badan 20 g, per hari selama 7 hari. Dengan kandungan Flavonoid total dalam ekstrak etanol Daun Ungu sebesar 1,78% maka :

**Dosis sediaan yang digunakan :**

**0,2 ml suspensi ekstrak etanol Daun Ungu 1,02% per mencit per hari atau 0,036 mg flavonoid total per mencit per hari.**

## **2. Uji Bioaktivitas**

### **2.1. Uji terhadap fungsi fagositosis**

Fungsi fagositosis sel-sel granulosit diuji dengan menggunakan sel ragi sebagai sel target, yang ditunjukkan dengan menghitung Indeks Fagositosis (IF) yaitu jumlah ragi yang ditelan per 200 sel granulosit, yang menunjukkan kemampuan fagositosis sel granulosit. Pengaruh pemberian peroral Ekstrak Etanol Daun Ungu pada fungsi fagositosis dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.2. Indeks Fagositosis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan Sediaan uji dosis 1,02% suspensi ekstrak etanol Daun Ungu dengan pemberian selama 7 hari

| Mencit    | IF Kontrol | IF Perlakuan |
|-----------|------------|--------------|
| 1         | 0,395      | 0,295        |
| 2         | 0,215      | 0,235        |
| 3         | 0,285      | 0,365        |
| 4         | 0,395      | 0,335        |
| 5         | 0,335      | 0,205        |
| 6         | 0,280      | 0,175        |
| 7         | 0,205      | 0,195        |
| 8         | 0,295      | 0,205        |
| rata-rata | 0,300      | 0,251        |
| SD        | 0,072      | 0,071        |

Dari tabel di atas tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok tes dan kelompok kontrol pada  $p < 0,05$  ( $t$  hitung = 1,38 dan  $t$  tabel = 1,76)

## 2.2. Uji hemaglutinasi IgM

Pada pengujian ini antibodi yang dimaksud adalah antibodi yang spesifik terhadap sel darah merah domba (SDMD). Pengamatan yang dilakukan dengan melihat aglutinasi yang terjadi dan dihitung sebagai **Titer aglutinasi** yaitu pengenceran tertinggi dari serum yang masih memberikan reaksi aglutinasi positif. Pengaruh pemberian peroral ekstrak etanol Daun Ungu dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.3. Titer aglutinasi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan Sediaan uji dosis 1,02% suspensi ekstrak etanol Daun Ungu dengan pemberian selama 7 hari

| Mencit    | Titer aglutinasi |                    |
|-----------|------------------|--------------------|
|           | Kelompok kontrol | Kelompok perlakuan |
| 1         | 32               | 32                 |
| 2         | 16               | 32                 |
| 3         | 32               | 16                 |
| 4         | 64               | 64                 |
| 5         | 32               | 16                 |
| 6         | 16               | 64                 |
| 7         | 32               | 8                  |
| 8         | 128              | 16                 |
| rata-rata | 44               | 31                 |
| SD        | 37,03            | 21,99              |

Dari tabel diatas tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara titer antibodi IgM dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada  $p < 0,05$  ( $t$  hitung = 1,7 dan  $t$  tabel = 1,76).

### 2.3. Uji terhadap sekresi TNF- $\alpha$

Pada pengujian ini monosit yang digunakan dirangsang dengan lipopolisakarida. Kemampuan monosit dalam mensekresi TNF-a diukur dengan membandingkan Optical Density Unit antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Pengaruh pemberian peroral ekstrak etanol Daun Ungu dapat dilihat pada tabel berikut :



Tabel 5.4. Optical Density Unit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan metode ELIZA  
Sediaan uji dosis 1,02% suspensi ekstrak etanol Daun Ungu dengan pemberian selama 7 hari

| Mencit    | Optical Density unit |                    |
|-----------|----------------------|--------------------|
|           | Kelompok kontrol     | Kelompok perlakuan |
| 1         | 0,285                | 0,384              |
| 2         | 0,372                | 0,331              |
| 3         | 0,425                | 0,351              |
| 4         | 0,396                | 0,396              |
| 5         | 0,404                | 0,360              |
| 6         | 0,370                | 0,371              |
| 7         | 0,367                | 0,376              |
| 8         | 0,311                | 0,355              |
| rata-rata | 0,3662               | 0,3655             |
| SD        | 0,0418               | 0,02143            |

Tabel diatas menunjukkan tidak ada perbedaan sekresi TNF- $\alpha$  antara mencit kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ozaki dkk. yang mengemukakan bahwa fraksi yang aktif sebagai antiinflamasi diduga mengandung flavonoid, maka dilakukan pembuatan profil kromatogram ekstrak etanol Daun Ungu dengan HPLC (degradasi eluen MeOH 10% sampai MeOH 100% selama 50 menit dengan kecepatan aliran 1 ml/menit) dan profil kromatogram hasil hidrolisa ekstrak etanol Daun Ungu dengan HPLC (degradasi eluen MeOH 50% sampai MeOH 60% selama 10 menit dan MeOH 60% sampai MeOH 100% selama 5 menit). Dari sini terlihat pada profil hasil hidrolisa ekstrak etanol, bila dibandingkan dengan standar dapat diketahui adanya aglikon flavonoid yaitu myricetin dan kaempferol.

Dari penetapan kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol Daun Ungu diketahui bahwa kadar flavonoid total dalam ekstrak tersebut adalah sebesar 1,78%. Dosis imunologis yang digunakan adalah 0,2 ml suspensi ekstrak etanol Daun Ungu 1,02% yang setara dengan 0,2 ml infus 10 % (Maat S.1997) mengandung 0,036 mg flavonoid total. Data kandungan total flavonoid total ini dapat digunakan untuk dasar perbandingan dosis bagi penelitian selanjutnya. Disebabkan kadarnya yang relatif besar (1,78%), maka dapat dilakukan isolasi kandungan flavonoid untuk penentuan senyawa aktifnya.

Injeksi satu dosis suatu substansi asing ke dalam binatang yang mampu membuat respon imun akan menghasilkan antibodi spesifik yang muncul dalam serum sesudah beberapa waktu berlangsung. Pemaparan pertama pada imunogen membangkitkan respon primer. Segera sesudah pengenalan dengan imunogen, sedikit antibodi atau tidak ada antibodi yang ditemukan dalam serum. Selama waktu tersebut

imunogen dikenal sebagai benda asing, sinyal dikirim pada sel-sel yang ditugaskan untuk membuat antibodi.

Respon primer pada kebanyakan imunogen dikarakterisasi oleh antibodi Imunoglobulin M(IgM). Imunoglobulin merupakan kumpulan molekul-molekul protein pelaksana imunitas humoral. IgM adalah imunoglobulin yang terbesar ukurannya, sehingga hampir seluruhnya berada di intravaskuler. Makromolekul ini adalah suatu aglutinator antigen-antigen tertentu yang sangat penting pada hari-hari pertama respon imun primer (Belanti,1993).

Dalam penelitian ini IgM yang terbentuk bersifat spesifik terhadap antigen sel darah merah domba (SDMD) yang bersifat T-dependent. Dipilihnya SDMD, karena merupakan antigen yang terbaik untuk pengujian produksi antibodi pada hewan percobaan mencit (Hudson,1989). Pengamatan hasil dilakukan dengan uji aglutinasi dengan antigen yang sama (SDMD).

Pada penelitian ini, pemberian peroral 0,2 ml suspensi ekstrak etanol Daun Ungu 1,02% selama 7 hari tidak menurunkan produksi IgM pada mencit yang diinjeksi dengan SDMD (Tabel 5.3. Rata-rata titer IgM kelompok kontrol = 44 ; Rata-rata titer IgM kelompok perlakuan 31 ; tidak berbeda pada  $p < 0,05$ ).

Proses fagositosis adalah bagian dari respon imun non spesifik dan memainkan peran pada pertemuan pertama hospes dengan benda-benda asing. Proses fagositosis juga dipermudah oleh antibodi, karena partikel-partikel yang diselimuti antibodi ditelan secara lebih efisien, dan oleh komplemen yang merupakan suatu seri protein serum dalam reaksi yang berurutan. Proses ini dibagi dalam dua fase yaitu fase perlekatan dan fase ingesti. Pada fase perlekatan terjadi sentuhan antara partikel asing dengan permukaan sel fagosit. Selanjutnya sel fagosit akan menginvasi membran plasmanya dan kemudian partikel dimasukkan ke dalam sitoplasma dan ditutup dalam vakuola (fagosom). Granula-granula lisosom dalam leukosit masuk bersamaan dengan

fagosom dan membran keduanya berfusi menjadi fagolisosom. Granula-granula tersebut pecah dan melepas isi enzimatiknyanya ke dalam vakuola dan bercampur dengan partikel-partikel yang diingesti (Belanti,1993). Pemberian per-oral ekstrak etanol Daun Ungu tidak menurunkan aktivitas fagosit untuk memfagosit sel ragi sebagai antigen (Tabel 5.2. Rata-rata IF kelompok kontrol = 0,300; Rata-rata IF kelompok perlakuan 0,251; tidak berbeda pada  $p < 0,05$ ).

Untuk dapat melaksanakan fungsinya, sel monosit/makrofag harus diaktivasi terlebih dahulu, dari fase istirahat menjadi fase aktif. Sel monosit/makrofag dikatakan dalam fase istirahat apabila tidak sedang berperang dengan *invader* atau tidak sedang melakukan proses pembersihan tubuh, dalam keadaan ini metabolisme tubuh dalam keadaan basal, tetapi siap menerima rangsangan yang dapat membawanya ke dalam fase aktif (Sigal,1994).

Aktivasi makrofag yang menghasilkan makrofag aktif, dapat dirangsang terus untuk membentuk makrofag hiperaktif yang ditandai dengan terjadinya peningkatan fungsi seperti peningkatan produksi TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  merupakan sitokin yang ditemukan dalam kadar yang tinggi pada penyakit-penyakit inflamasi yang dapat merangsang akumulasi dan aktivasi sel-sel inflamasi sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan.

Dalam pengujian ini antigen yang digunakan untuk merangsang makrofag adalah LPS(lipopolisakarida), yaitu suatu endotoksin yang merupakan komponen dari dinding sel bakteri gram negatif. Pemberian per-oral 0,2 ml suspensi ekstrak etanol Daun Ungu 1,02% tidak mempengaruhi sekresi TNF- $\alpha$  oleh makrofag (Tabel 5.4. Rata-rata OD Unit kelompok kontrol = 0,3661 ; Rata-rata OD Unit kelompok perlakuan = 0,3655; tidak berbeda pada  $p < 0,05$ ), yang berarti Daun Ungu tidak dapat mendorong

makrofag sampai ke fase hiperaktif. Hal ini memberikan keuntungan yaitu dapat mengurangi efek samping dari TNF- $\alpha$  seperti timbulnya kerusakan jaringan.

Dari hasil analisa statistik, tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada  $p < 0,05$  walaupun terlihat adanya penurunan nilai indeks fagositosis (tabel 5.2) dan nilai titer antibodi primer IgM (tabel 5.3). Dengan demikian penurunan atau perbedaan nilai-nilai tersebut dipengaruhi oleh adanya variabel-variabel yang tidak terkendali.

Penurunan pada pembentukan respon antibodi primer IgM disebabkan karena adanya stimulasi pada sel T supresor sehingga menghambat rangsangan pada limfosit B untuk berproliferasi, berdiferensiasi, menghasilkan antibodi dan sel memori (Sütes & Terr, 1991). Untuk itu penelitian ini perlu dilanjutkan dengan melihat pengaruh Daun Ungu pada sel T supresor ataupun pada sel limfosit B untuk memperjelas pengaruhnya pada respon pembentukan antibodi baik primer maupun sekunder.

Sedangkan fagositosis dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti antibodi dan komplemen yang dapat meningkatkan terjadinya fagositosis melalui pembentukan opsonisasi antigen, sehingga perlu dilanjutkan dengan melihat pengaruh Daun Ungu pada sistem komplemen. Disamping itu faktor lain yang juga sangat penting pada inflamasi adalah kemotaksis atau pergerakan sel-sel fagosit ke daerah inflamasi sebagai respon terhadap faktor seperti produk bakteri, faktor yang dilepas sel-sel inflamasi itu sendiri seperti sitokin (Interleukin dan TNF- $\alpha$ ).

Karena respon inflamasi dapat berfungsi baik pada cabang aferen maupun cabang eferen dari respon imun, maka amatlah sukar untuk memisahkan secara jelas dan tegas pengaruh antiinflamasi dari pengaruh immunosupresif. Sehingga mekanisme dari antiinflamasi yang digunakan harus diketahui dengan jelas, agar dapat menyeimbangkan supresi reaktivitas imun yang menyimpang dari kebiasaan yang

diinginkan secara terapeutik dan kemungkinan supresi mekanisme pertahanan hospes normal terhadap infeksi yang berbahaya (Bellanti, 1993).

Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa Daun Ungu tidak mempengaruhi beberapa sistem imun yang diuji, sehingga diharapkan Daun Ungu sebagai antiinflamasi tidak menurunkan kepekaan respon imun hospes terhadap infeksi selama penggunaannya.

Penelitian-penelitian mengenai aktivitas flavonoid yang telah banyak dilakukan, menunjukkan bahwa flavonoid merupakan *radical scavenger* yang baik yang dapat mempengaruhi baik secara langsung maupun tidak langsung pada proliferasi limfosit T, menghambat influks Kalsium dan menghambat jalur 5-lipooksigenase dari metabolisme asam arakidonat. Karena itu penelitian ini sangat perlu untuk dilanjutkan pada sistem-sistem tersebut.

## **BAB VII**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **1. SIMPULAN**

Pemberian peroral 0,2 ml suspensi ekstrak etanol Daun ungu 1,02% yang mengandung flavonoid total 0,036 mg per-mencit tiap hari selama 7 hari :

1. Tidak mempengaruhi pembentukan antibodi primer IgM terhadap antigen sel darah merah domba pada mencit.
2. Tidak mempengaruhi fungsi fagositosis terhadap antigen sel ragi
3. Tidak mempengaruhi sekresi TNF- $\alpha$  oleh monosit yang dirangsang oleh lipopolisakarida

#### **2. SARAN**

Diperlukan penelitian lanjutan mengenai jalur mekanisme inflamasi seperti pada sel-sel imunokompeten yang lain untuk lebih mengetahui pengaruh Daun Ungu pada sistem imun. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian pada mekanisme inflamasi yang lain misalnya pada sistem komplemen, jalur metabolisme asam arakidonat, maupun mengenai kandungan senyawa aktifnya.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS.1991. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, WB Saunders Company.pp. 225-294
2. Berg P.A. and Daniel P.T.1988. Effects of Flavonoid Compounds on the Immune Response. Plant Flavonoids Biology and Medicine II. Alan R. Liss Inc., New York.pp. 45 - 55
3. Beretz A. and Cazenave J.P. 1988. The Effect of Flavonoids on Blood-Vessel Wall Interaction. Plant Flavonoids Biology and Medicine II. Alan R. Liss Inc., New York.pp. 187 - 200
4. Chanarin I. 1989. Laboratory Haematology an Account of Laboratory Technique. Churchill Livingstone. Edinburg London Melbourne and New York.pp. 231-251
5. Clark WR.1983. The Experimental Foundation of Modern Immunology. Second Edition. John Willey and Son, New York.pp. 207-213
6. Cody V. 1988. Crystal and Molecular Structures of Flavonoids. Plant Flavonoids Biology and Medicines II. Alan R Liss Inc. New York. pp. 93 - 106
7. Daniel P.T., Holzschuh J., Diao G.J. and Berg P.A.1988. Interference of the Flavonoid Compound Cianidanol with Macrophage Function and Lymphocyte Activating Mechanisms. Plant Flavonoids Biology and Medicine II. Alan R. Liss Inc., New York.pp. 201 - 204
8. Dey PM, Harborne JB.1991. Methods in Plant Biochemistry. Vol.6. Assays for Bioactivity. London Academic Press.IX
9. Eisen HN.1982. Immunology. Second edition. Harper and Row Publisher, Philadelphia.pp.494-501
10. Fudenberg HH, Whitten HD, Ambrogi F. 1984. Immunomodulator : New Frontier and Advance. Plenum Press New York and London.pp.293-331



11. Gene R.M.1996. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera* : Identification of its Active Constituents. Planta Medica 62 : 232 - 235
12. Glen J, Lawlor J. 1981. Manual Allergy and Immunology : Diagnosis and Therapy. Little Brown and Company, Boston.pp.1-13
13. Grieco MH, Meriney DK.1985. Immunodiagnosis for Clinicians : Interpretation of Immunoassays. Year Book Medical Publisher Inc. Chicago London.pp.3-40
14. Harborne J.B.1988. Flavonoids : Advances in Research. vol 2. London : Chapman & Hall
15. Hasler A., sticher O. 1990. High-performance Liquid Chromatographic Determination of Five Widespread Flavonoid Aglycones. Journal of Chromatography 508 : 236 - 240
16. Heras B., Hoult JRS. 1994. Non-Cytotoxic Inhibition of Macrophag Eicosanoid Biosynthesis and Effects on Leucocyte Functions and Reactive Oxygen Species of Two Novel Anti-Inflammatory Plant Diterpenoids. Planta Medica 60 : 501 - 506
17. Hirabayashi T., Ochiai H., Sakai S., Nakajima K. and Terasawa K. 1995. Inhibitory Effect of Ferulic acid and Isoferulic acid on Murin Interleukin-8 Production in Response to Influenza Virus Infections in vitro and in vivo. Planta Medica 61 : 221 - 226
18. Hokama Y. and nakamura M.R. 1982. Immunology and Immunopathology Basic Concept. 1 th edition. Little Brown and Co. Boston pp. 135 - 245
19. Hudson L, Hay FC. 1989.Practical Immunology, third edition. Blackwell Scientific Publication, Oxford London Edinburg Melbourne.pp. 43-65, 447-454
20. Hume CW.1972.The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animal.Forth edition. Churchill Livingstone, Edinburg and London.pp. 199-204

21. Hyde R.M. and Patnode R.A. 1987. Immunology. The National Medical Series for Independent Study. A Wiley Medical Publication. New York. pp. 61 - 83
22. Im Lee G. et al.1995. Inhibitory Effects of Oriental Herbal Medicines on IL-8 Induction in Lipopolysaccharide Activated Rat Macrophages. Planta Medica 61 : 26 - 30
23. Jaffe SH, Sherwin SA.1991.Immunomodulators. In : Stites DP, Terr IA. Basic and Clinical Immunology. Seventh Edition. A Lange Medical Book. Prentice-Hall International Inc.pp.780-786
24. Kuo S et al. 1995. Potent antiplatelet, Anti-Inflammatory and Antiallergic Isoflavanquinones from the Roots of *Abrus precatorius*. Planta Medica 61 : 307 - 312
25. Markham K.R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB
26. Merfort I., Heilmann J., Weiss M., Pietta P. and Gardana C. 1996. Radical Scavenger Activity of Three Flavonoid Metabolites Studied by Inhibition oh Chemiluminescences in Human PMNs. Planta Medica 62 : 289 - 291
27. Miller W.G. and Nussenziweig V.1974. Complement as a Regulator of Interactions between Immune Complexes and Cell Membranes. The Journal of Immunology 113 : 93 - 108
- 28.Mills J.1991. Viral Infection in : Stites DP, Terr IA. Basic and Clinical Immunology. Seventh Edition.A lange Medical Book. Prentice-Hall International Inc.pp.646-656
29. Mishell BB, Shiigi SM.1980. Selected Methods in Cellular Immunology. WH Freeman and Company, New York. pp.153-160
30. Mizukoshi S., Tsukamoto M., Tanaka H., Nakamura K. and Kato F. 1994. Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Effect of 1,6-Anhidro-3,4-dideoxy-2-

- furfuryl-b-D-*threo*-3-enopyranose(MT2221), a Novel Anhidro-enopyranose Derivative, on Experimental Animal Models. Biological Pharmaceutical Bulletin 17(8) : 1070 - 1074
31. Mori H. 1995. Principle of the Bark of *Phellodendron amurense* to Suppress the Cellular Immune Response : Effect of Phellodendrine on Cellular and Humoral Immune Responses. Planta Medica 61 : 45 - 49
32. Nakamura K., Tsuji K., Konishi N., Okumura H. and Matsuo M. 1993. Studies on Anti-Inflammatory Agents. II. Synthesis and Pharmacological Properties of 2'-(Phenylthio)methanesulfonanilides and Related Derives. Chemical Pharmaceutical Bulletin 41(5) : 894 - 906
33. Olsson E., Holth A., Kumlin E., Bohlin L. and Wahlberg I. 1993. Structure-Related Inhibiting Activity of Some Tobacco Cembranoids on Prostaglandin Synthesis in Vitro. Planta Medica 59 : 293 - 295
34. Onai N. et al. 1995. Inhibitory Effects of Bisbenzylisoquinolin Alkaloids on Induction of Proinflammatory Cytokines, Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . Planta Medica 61 : 497 - 501
35. Ozaki Y. 1995. Studies on Anti-Inflammatory Effect of Japanese Oriental Medicines (Kampo medicines) Used to Treat Inflammatory Diseases. Biological Pharmaceutical Bulletin 18(4) : 559 - 562
36. Ozaki Y., Sekita S., Soedigdo S. and Harada M. 1989. Antiinflammatory Effect of *Graptophyllum pictum* (L.).Griff. Chemical Pharmaceutical Bulletin 37(10) : 2799-2802
37. Perez M.H., Rabanal R.M., de la Torre M.C. and Rodriquez B. 1995. Analgesic, Anti-Inflammatory, Antipyretic and haematological Effects of Aethiopirone, an o-

- Naphthoquinone Diterpenoid from *Salvia aethiopsis* Roots and two Hemisynthetic Derivatives. Planta Medica 61 : 505 - 509
38. Pignol B. et al.1988. Role of Flavonoids in the Oxygen-Free Radical Modulation of the Immune Response. Plant Flavonoids Biology and Medicine II. Alan R. Liss Inc., New York.pp. 173 - 182
39. Platt-Mills T and Ishizaka K. 1974. Activation of the Alternative Pathway of Human Complement by Rabbit Cells. The Journal of Immunology 113 : 145 - 151
40. Roitt I, Brostoff J, Male D. 1993. Immunology, Third Edition. Churchill Livingstone, Gower Medical Publishing, 1.1-2.15,8.1-8.15, 9.2-9.12
41. Roitt I.1994. Essential Immunology, Eight Edition, Oxford Blackwell Scientific Publication.5-20
42. Romagnani S.1994.  $T_H^1$  and  $T_H^2$  subsets of  $CD_4^+$  T Lymphocytes.Scientific American , Science and Medicine, May-June. 68-71
43. Ron Y. 1994. Ontogeny and Differentiation of T Lymphocytes : B-T cell Function, in : Sigal L.H. Ron Y Immunology and Inflammation : Basic Mechanisms and Clinical Consequences. Mc Graw Hill Inc. 142
44. Rehwald A., Meier B., Mutsch M., Sticher O. 1993. HPLC Analysis of the Flavonoids of *Crataegi folium cum flore*. Planta Medica 59 : A628 - A629
45. Schneider G. 1975. Pharmazeutische Biologie. Mannheim-Wien-Zurich : B.I.Wissenschaftsuerlag.
46. Tschan G.M., Sticher O. 1993. Quantitative Analysis of Flavonoids in Roman Chamomile by RP-HPLC. Planta Medica 59 : A628
47. Wollenweber E. 1988. Occurrence of Flavonoid Aglycones in Medicinal Plants. Plant Flavonoids Biology and Medicine II. Alan R. Liss Inc., New York.pp. 45 - 55

