

SKRIPSI

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees.) SEBAGAI
IMUNOSTIMULATOR PADA MENCIT YANG DIINFEKSI
Salmonella thypimurium TERHADAP EKSPRESI
INTERFERON GAMMA (IFN- γ)**



Oleh

DEKA AMALIA
NIM 061211131041

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* NEES.) SEBAGAI IMUNOMOSTIMULATOR PADA MENCIT YANG DIINFEKSI *Salmonella thypimurium* TERHADAP EKSPRESI INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga


oleh

DEKA AMALIA

NIM 061211131041

Menyetujui

Komisi Pembimbing,


(Prof. Dewa Ketut Meles, Dr., MS., drh.)
Pembimbing Utama


(Dr. Poedji Hastutiek, M.Si., drh.)
Pembimbing Serta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees.) SEBAGAI IMUNOSTIMULATOR PADA MENCIT YANG DIINFEKSI *Salmonella thypimurium* TERHADAP EKSPRESI INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

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

Surabaya, Agustus 2019



Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 26 Juni 2019

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Rochmah Kurnijasanti, drh., M.Si.
Sekretaris : Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes.
Anggota : Dr. Nove Hidajati, drh., M.Kes.
Pembimbing Utama : Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.Si.
Pembimbing Serta : Dr. Poedji Hastutiek, drh., M.Si.

Telah diuji pada Seminar Skripsi

Tanggal: 05 Agustus 2019

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Rochmah Kurnijasanti, drh., M.Si.
Sekretaris : Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes.
Anggota : Dr. Nove Hidajati, drh., M.Kes.
Pembimbing Utama : Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., M.Si.
Pembimbing Serta : Dr. Poedji Hastutiek, drh., M.Si.

Surabaya, 05 Agustus 2019

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,

Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes

NIP. 195601051986011001

THE EFFECT OF IMUNOSTIMULATOR SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees.) EXTRACT ON GAMMA INTERFERON IN MICE INFECTED BY *Salmonella typhimurium*

Deka Amalia

ABSTRACT

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) extract is a herbal medicine that used to be an imunostimulator when the body is getting ill and decline in body function. The purpose of this research is to prove that therapy of sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) etanol extract has andrographolide content which had potentially increase against imun respon. The object of the research were to prove the effect of *Andrographis paniculata* Nees. *Salmonella typhimurium* infected mice. Twenty five mice were divided into five experimental groups on the therapy of sambiloto leaf *Andrographis paniculata* Nees. extract for 6 days, and twenty five mice others on the therapy of sambiloto leaf *Andrographis paniculata* Nees. extract for 13 days. All groups, except K(-), infected with 10^5 cells/0,5 ml *Salmonella typhimurium* intraperitoneally. After five days incubation period, mice were given extract of sambiloto leaf *Andrographis paniculata* Nees. in different doses, which were P1 with 4.42 mg/25g BW/day, P2 with 6.82 mg/25g BW/day, P3 with 9.25 mg/25g BW/day, while P0 is an experimental group which not given on therapy of sambiloto leaf *Andrographis paniculata* Nees. extract. The data were analyzed using one way (ANOVA). The observe parameters were IFN- γ with imunohistokimia technique. The result of this research showed that there were no significant differences ($p > 0.05$) between treatment groups in indicates that increase the production IFN- γ . More higher dose of treatments would be increase and ensure conclude that *Andrographis paniculata* Nees. has the imunostimulator.

Key words: Sambiloto, *Salmonella typhimurium*, mice, Imunohistokimia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur atas Rahmat dan Hidayah Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi dengan judul **“Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) Sebagai Imunostimulator Pada Mencit Yang Diinfeksi *Salmonella thypimurium* Terhadap Produksi Interferon Gamma (IFN- γ)”**.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Dewa Ketut Meles, drh., MS. selaku dosen pembimbing pertama dan Dr. Poedji Hastutiek, drh., M.Si. selaku pembimbing kedua, atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesai penelitian dan skripsi ini.

Dr. Rochmah Kurnijasanti, drh., M.Kes selaku ketua penguji, Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes selaku sekretaris penguji dan Dr. Nove Hidajanti, drh., M.Kes selaku anggota penguji atas kesediaan waktu menguji dan menilai skripsi ini. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M. Kes selaku dosen wali yang selama ini telah sabar memberikan bimbingan akademik dan perwalian selama menempuh kuliah.

Seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Ayah Ismail M.Amin, Ibu Mahyuni dan adik tercinta Deni Ismanto, Dinda Oktaviani, Dika Reski yang selalu memberikan bantuan doa, semangat, motivasi, nasihat dan materi kepada penulis. Keluarga besar Alm. H Muhammad Amin HF yang senantiasa selalu memberikan dukungan dengan curahan cinta kasih dan doa

yang tulus, semangat, pengorbanan, dan ketulusannya dalam mendampingi penulis selama ini. Semoga makalah ini dapat dijadikan referensi dan menambah pengetahuan bagi yang memanfaatkannya.

Surabaya, Agustus 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN

| | |
|-------------------------------------|----------|
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iii |
| HALAMAN IDENTITAS | iv |
| ABSTRACT..... | vi |
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | vii |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xiv |
| SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG | xv |
| BAB 1 PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Landasan Teori | 3 |
| 1.4 Tujuan Penelitian..... | 6 |
| 1.5 Manfaat Penelitian..... | 6 |
| 1.6 Hipotesis Penelitian | 6 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | 8 |
| 2.1. Sambiloto..... | 8 |
| 2.1.1 Klasifikasi | 8 |
| 2.1.2 Nama Daerah..... | 8 |
| 2.1.3 Morfologi | 9 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.1.4 | Penyebaran Tanaman | 9 |
| 2.1.5 | Kandungan kimia | 10 |
| 2.1.6 | Khasiat dan Kegunaan | 10 |
| 2.1.7 | Kandungan Sambiloto Terhadap Imunostimulator | 11 |
| 2.2 | Imunostimulator | 12 |
| 2.3 | Sistem Imun..... | 13 |
| 2.3.1 | Sistem imun spesifik | 14 |
| 2.3.2 | Sistem Imun Non spesifik..... | 15 |
| 2.4 | Interferon Gamma (IFN)- γ | 15 |
| 2.5 | <i>Salmonella typhimurium</i> | 16 |
| 2.5.1 | Morfologi <i>Salmonella typhimurium</i> | 17 |
| 2.5.2 | Patogenesis penyakit | 17 |
| 2.5.3 | Gejala Klinis | 18 |
| 2.5.4 | Respon Imun terhadap Bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> | 19 |
| 2.6 | Pengenceran Bakteri | 20 |
| 2.7 | Uji Imunohistokimia..... | 20 |
| 2.8 | Mencit..... | 22 |
| BAB 3 | MATERI DAN METODE PENELITIAN..... | 24 |
| 3.1 | Tempat dan Waktu Penelitian | 24 |
| 3.2 | Bahan dan Materi Penelitian | 24 |
| 3.2.1 | Bahan penelitian..... | 24 |
| 3.2.2 | Alat penelitian | 25 |
| 3.3 | Metode Penelitian | 26 |
| 3.3.1 | Pembuatan simplisia daun sambiloto..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Pembuatan ekstrak daun sambiloto..... | 26 |
| 3.3.3 Dosis konversi ekstrak daun sambiloto..... | 27 |
| 3.3.4 Identifikasi bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> | 28 |
| 3.3.5 Pengenceran bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> | 28 |
| 3.3.6 Infeksi bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> | 29 |
| 3.3.7 Prosedur pemeriksaan ekspresi IFN- γ pada organ limpa..... | 29 |
| 3.4 Rancangan Penelitian | 33 |
| 3.5 Variabel Penelitian | 33 |
| 3.5.1 Variabel Tergantung | 33 |
| 3.5.2 Variabel Bebas | 33 |
| 3.5.3 Variabel Terkendali..... | 34 |
| 3.6 Prosedur Penelitian..... | 34 |
| 3.7 Analisis Data | 35 |
| 3.8 Kerangka Penelitian..... | 36 |
| BAB 4 HASIL PENELITIAN | 37 |
| BAB 5 PEMBAHASAN | 41 |
| BAB 6 PENUTUP..... | 44 |
| 6.1 Kesimpulan..... | 44 |
| 6.2 Saran..... | 44 |
| DAFTAR PUSTAKA | 47 |
| RINGKASAN | 45 |
| Lampiran | 52 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|----------------|
| 3.1 Konversi perhitungan dosis..... | 52 |
| 4.1 Skala semikuantitatif IRS (<i>Immuno Reactive Score</i>)..... | 32 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|----------------|
| 2.1 Sambiloto (<i>A.paniculata</i> Nees)..... | 9 |
| 2.2 <i>S.typhimurium</i> (Hasil uji mikroskopis perbesaran 1000x..... | 17 |
| 4.1 Perbandingan produksi interferon gamma pada sel-sel limfosit..... | 39 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|----------------|
| 1. Konversi Peghitungan Dosis..... | 52 |
| 2. Identifikasi Bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> | 53 |
| 3. Dokumentasi Penelitian..... | 54 |
| 4. Analisis Data Dengan SPSS..... | 57 |
| 5. Hasil Skoring Preparat Histopatologi Organ Limpa..... | 58 |

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

| | |
|--------------------|---|
| ANOVA | = Analisis of Variance |
| APC | = <i>Antigen Presenting Cell</i> |
| BNJ | = Beda Nyata Jujur |
| CMC Na | = Carboxy Methil Cellulose Natrium |
| CFU | = Colony Forming Units |
| DAB | = <i>Diaminobenzidine</i> |
| EDTA | = Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid |
| <i>ETEC</i> | = <i>Enterotoksigenic E. Coli</i> |
| IFN- α | = Interferon Alfa |
| IFN- γ | = Interferon Gamma |
| IHK | = Immunohistokimia |
| IMVIC | = <i>Indol Metil red Voges proskeur Citrate</i> |
| IRS | = <i>Immuno Reactive Score</i> |
| KIA | = <i>Kliger Iron Agar</i> |
| MHC | = <i>major histocompatibility complex</i> |
| MR-VP | = <i>Methyl Red and Voges Proskauer</i> |
| NaCl | = Natrium Chlorida |
| NAS | = <i>Nutrient Agar Slant</i> |
| PAP | = Peroksidase-anti peroksidase |
| pH | = Power of Hydrogen |
| RAL | = Rancangan Acak Lengkap |
| SSA | = <i>Salmonella-Shigella Agar</i> |
| SA-HRP | = <i>Streptavidin-Horse Radish Peroksidase</i> |
| SPSS | = <i>Statistical Package for the Social Science</i> |
| TNF | = <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TSB | = <i>Trypticase Soy Broth</i> |
| WHO | = World Health Organization |
| $^{\circ}\text{C}$ | = Derajat Celcius |

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berbagai macam agen patogen baik berupa bakteri, virus, fungi, dan parasit dapat menyerang hewan dan menyebabkan terjadinya infeksi. Tubuh hewan menangkal serangan mikroorganismenya tersebut melalui mekanisme sistem pertahanan setiap agen patogen (Tizard, 2008).

Sistem pertahanan tubuh melawan agen infeksius ini dapat berupa sistem imun spesifik dan sistem imun non-spesifik (Williams *et al.*, 2012). Sistem pertahanan tubuh sangat bermanfaat pada saat terjadi penularan melalui suatu agen infeksi seperti bakteri, virus dan agen lainnya (Kumar *et al.*, 2011).

Saat ini banyak obat sintesis kimia yang digunakan di dunia kedokteran hewan. Namun jenis ini kerap memberikan efek samping yang merugikan. Obat herbal dipercaya aman dan ampuh mengatasi penyakit serta lebih simple dan spesifik dalam penggunaannya. Salah satu tanaman obat yang ingin diteliti adalah sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang sering dianggap pengganggu karena pertumbuhannya dan penyebarannya yang sangat cepat dan tanaman ini dapat ditemukan di hampir seluruh wilayah Indonesia.

Riset Ilmiah telah membuktikan bahwa ekstrak sambiloto mengandung berbagai bahan aktif, salah satunya andrographolide. Zat ini diketahui meningkatkan produksi sel-sel mononuclear darah tepi, *tumor necrosis factor* (TNF)- α , interferon (IFN)- α , dan (IFN)- γ , meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, serta meningkatkan toksisitas yang dimediasi sel NK dari sel-sel mononuclear darah tepi untuk merusak sel kanker. Dari aktivitas tersebut

menunjukkan bahwa andrographolide dapat bertindak sebagai imunostimulan yang mampu menstimulan baik fungsi kekebalan spesifik ataupun tidak spesifik melalui sel NK, makrofag, dan induksi sitokin (Jarukarmjorn dan Nemoto, 2008).

Di Indonesia, penyakit salmonellosis oleh *Salmonella typhimurium* banyak ditemukan pada hewan ternak sapi dan unggas, ayam misalnya, dimana peternak kurang menjaga kebersihan kandangnya. Penularannya pun dapat terjadi dengan sangat cepat, hal ini terjadi karena tingkat kebersihan kandang oleh sebagian besar peternak masih rendah, sehingga pakan dan minuman dengan mudah tercemar dengan tinja dari ternak yang terinfeksi. Pada ternak sapi yang sedang bunting menyebabkan abortus dan endometritis dengan infertilitas yang sementara. Pada keadaan infeksi yang sudah kronik hewan menjadi kurus, demam intermiten, diare yang persisten dan sulit sekali diobati, malah menjadi hewan pembawa penyakit. Sapi, unggas, domba, dan babi reservoir utama pada infeksi manusia (Dharmojono, 2001).

Upaya penanggulangan masalah penyakit menjadi suatu upaya yang harus dilakukan demi kesejahteraan kesehatan hewan yang nantinya juga berdampak pada kesehatan manusia. Penggunaan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai obat herbal terhadap adanya penyakit, selain dengan efek samping yang relatif kecil juga mempunyai nilai ekonomis yang lebih daripada penggunaan obat modern bagi para peternak, khususnya peternak skala kecil yang pada umumnya mereka selalu menekan faktor harga terhadap kebutuhan ternaknya agar tidak terjadi adanya kerugian. Kusmardi dkk. (2007) memaparkan tentang mahalnnya imunostimulator yang tersedia di pasaran, yang mayoritas diimpor dari luar negeri,

sehingga menjadi salah satu hambatan bagi pasien dan para peternak dan menjadi pertimbangan kembali dalam menekankan faktor harga.

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian ini dilakukan untuk menguji pengaruh pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) sebagai imunostimulator terhadap ekspresi interferon gamma dengan menggunakan hewan mencit sebagai hewan coba yang diinfeksi bakteri *Salmonella thypimurium*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan di atas maka didapat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dapat meningkatkan ekspresi interferon gamma pada limpa mencit yang diinfeksi *Salmonella thypimurium*?
2. Berapakah dosis efektif ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang dapat memberikan hasil optimal terhadap peningkatan ekspresi interferon gamma pada limpa mencit?

1.3 Landasan Teori

Salmonella merupakan patogen zoonotic yang dapat menyerang vertebrata. Infeksi akibat *Salmonella* pada manusia dan hewan ternak menyebabkan penyakit yang bersifat asimtomatik hingga infeksi sistemik yang parah yang berakhir dengan mortalitas yang tinggi. Infeksi pada hewan secara ekonomi penting karena berpengaruh terhadap morbiditas dan mortalitas. Bahkan jauh lebih penting terhadap kesehatan manusia, salmonellosis dapat tertular akibat kontak langsung atau tidak langsung dengan hewan yang bersifat reservoir (Libby, 2004).

Penyakit yang disebabkan oleh Salmonella disebut *salmonellosis*. Penyakit ini terus meningkat dengan semakin intensifikasinya produksi peternakan dan teknik laboratorium yang semakin canggih. Bakteri dari genus Salmonella merupakan bakteri penyebab infeksi. Jika tertelan dan masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan gejala yang disebut salmonellosis. Gejala salmonellosis yang paling sering terjadi adalah gastroenteritis. Selain gastroenteritis, beberapa spesies Salmonella juga dapat menimbulkan gejala penyakit lainnya. Misalnya demam enterik seperti demam tifoid dan demam paratifoid, serta infeksi lokal (Poeloengan, 2014).

Respon imunitas tubuh baik alamiah maupun adaptif memiliki kemampuan mengatasi antigen asing yang masuk ke dalam tubuh, termasuk *S.typhimurium*. Peran fagosit dalam respon imunitas alamiah terhadap bakteri intraseluler seperti *S.typhimurium* kurang efektif, sebab bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom dan mempunyai kemampuan untuk menghindar dari proses *killing fagosit*, seperti mencegah fusi antara fagosom dan lisosom sehingga sulit untuk dibunuh. Makrofag tidak lagi efektif dalam memfagosit bakteri *S.typhimurium* (Abbas dan Lichtman, 2003). Keadaan ini menyebabkan respon imun spesifik teraktivasi oleh antigen *Salmonella*. Pertahanan tubuh terhadap bakteri intraseluler seperti *S.typhimurium* diperankan oleh limfosit T.

Sistem imunitas yang lebih efektif dalam mengeliminasi *S.typhimurium* adalah sistem imunitas adaptif seluler. Mekanisme sistem imunitas seluler terdiri dari pembunuhan mikroba yang terfagositosis sebagai hasil dari aktivasi makrofag oleh sitokin limfosit T (terutama IFN- γ) dan lisis sel yang terinfeksi CD8⁺ IFN- γ diproduksi oleh sel NK selama reaksi imun bawaan atau selama respon imun adaptif,

IFN- γ dapat memiliki kesamaan pada ekspresi molekul MHC I dan aktivasi sel T CD8⁺ (Abbas dan Litchman, 2006).

Pada dasarnya, tubuh memiliki zat yang secara alami akan melakukan penyeimbangan sistem kekebalan ke arah normal bila terjadi gangguan. Namun, ada kalanya tubuh tidak berhasil melakukan penyeimbangan sistem kekebalan ke keadaan normal dan akan mengalami penurunan fungsi ketika tidak mampu lagi mengeliminasi adanya bakteri, virus, ataupun parasit sebagai penyebab penyakit infeksi yang masuk ke dalam tubuh.

Ekstrak sambiloto merangsang organ limfoid untuk memperbanyak sel limfosit yang kemudian diedarkan. Organ Limfoid yang berperan dalam memperbanyak limfosit yang kemudian diedarkan ke seluruh jaringan pembuluh darah seperti limpa, sehingga membuat organ ini sering berhubungan dengan bakteri patogen. Aktivasi limfosit disebabkan oleh respon imun dan peran makrofag yang bertindak sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) kepada sel T helper (sel Th) serta sel NK dengan dikeluarkannya sitokin seperti interferon gamma (IFN- γ) sehingga akan memacu kembali aktivitas makrofag dalam memfagosit bakteri (Khasanah, 2009; Xu, 2009).

Obat herbal yang mengaktivasi imun disebut imunomodulator. Pengaruh imunostimulator diklasifikasikan sebagai imunostimulan, imunosupresan. Tanaman yang berpotensi sebagai imunostimulan adalah sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.). Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) kaya akan zat aktif yang dapat menstimulasi kekebalan terhadap antigen baik yang spesifik maupun non spesifik. Kekebalan spesifik ditandai dengan adanya peningkatan jumlah sel limfosit dalam peredaran darah, sedangkan kekebalan non spesifik ditandai dengan

adanya peningkatan jumlah sel heterofil, eosinofil dan basofil (Mills dan Bone dalam Xu, 2009).

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit BALB/c, dengan pertimbangan mencit adalah binatang yang mempunyai respon imun yang baik (Mangkuwidjojo, 2003). Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk menguji pengaruh pemberian ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) sebagai imunostimulator terhadap kadar interferon gamma, dengan menggunakan mencit sebagai hewan coba yang diinfeksi bakteri *Salmonella typhimurium*.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek imunostimulator ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) terhadap ekspresi interferon gamma pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.
2. Untuk mengetahui dosis yang paling efektif setelah pemberian ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang dapat meningkatkan ekspresi interferon gamma setelah diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini untuk memberikan informasi tentang manfaat ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) sebagai imunostimulator untuk meningkatkan kekebalan tubuh pada saat tubuh mengalami penurunan fungsi.

1.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah, maka dapat diajukan hipotesis yaitu:

1. Pemberian ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dapat meningkatkan ekspresi interferon gamma mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*
2. Pemberian ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dengan dosis 9,22 mg/hari efektif memberikan hasil optimal terhadap ekspresi interferon gamma pada mencit setelah diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sambiloto

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Yusron dkk. (2005), klasifikasi tanaman sambiloto sebagai berikut:

| | |
|------------|----------------------------------|
| Kingdom | : <i>Plantae</i> |
| Divisi | : <i>Spermathophyta</i> |
| Sub divisi | : <i>Angiospermae</i> |
| Kelas | : <i>Dicotyledone</i> |
| Sub kelas | : <i>Gamopetala</i> |
| Ordo | : <i>Personales</i> |
| Famili | : <i>Acanthaceae</i> |
| Sub famili | : <i>Acanthoidae</i> |
| Genus | : <i>Andrographis</i> |
| Spesies | : <i>Andrographis paniculata</i> |

2.1.2 Nama Daerah

Di beberapa daerah di Indonesia, sambiloto dikenal dengan berbagai nama. Masyarakat Jawa Tengah dan Jawa Timur menyebutnya dengan bidara, sambiroto, sandiloto, sadilata, takilo, paitan, dan sambiloto. Di Jawa Barat disebut dengan ki oray, takila, atau ki peurat. Di Bali lebih dikenal dengan samiroto. Masyarakat Sumatera dan sebagian besar masyarakat Melayu menyebutnya dengan pepaitan atau ampadu. Sementara itu, nama-nama asing sambiloto diantaranya chuan xin lian, yi jian xi, dan lan he lian (Cina), kalmegh, kirayat, dan kirata (India), xuyen tam lien dan congcong (Vietnam), quasabhuva (Arab), nainehavandi (Persia), green chiretta dan king of bitter (Inggris) (Widyawati, 2007).

2.1.3 Morfologi

Sambiloto tergolong tanaman terna (perdu) yang tumbuh tegak dengan tinggi 40-90 cm, memiliki batang berkayu dan memiliki banyak cabang yang terletak berlawanan. Bentuk daun lanset, ujung daun dan pangkal daun tajam atau agak tajam. Tepi daun rata, permukaan halus, dan berwarna hijau. Panjang daun 3-12 cm, lebar 1-3 cm. Panjang tangkai daun 5-25 mm, daun bagian atas bentuknya seperti daun pelindung. Mempunyai bunga tegak bercabang, panjang gagang bunga 3-7 mm dan panjang kelopak bunga 3-4 mm. Bunga berbibir dan berbentuk tabung dengan panjang 6 mm. Bibir bunga bagian atas berwarna putih dan warna kuning pada bagian ujung atasnya dengan ukuran 7-8 mm, bibir bunga bawah leher berbentuk biji berwarna ungu dengan panjang 6 mm. Tangkai sari agak sempit dan melebar pada bagian pangkal, memiliki panjang 6 mm. Bentuk buah jorong dengan ujung tajam, panjang kurang lebih 2 cm, apabila sudah tua akan pecah terbagi menjadi 4 keping (Departemen Kesehatan RI, 1979; Yusron, Januwati, dan Pribadi, 2005).



Gambar 2.1 Sambiloto (*A.paniculata* Nees) (Ratnani dkk, 2012).

2.1.4 Penyebaran Tanaman

Penyebaran tanaman ini hampir di seluruh dunia dan berlangsung sangat cepat. Tanaman ini menyebar luas pada daerah tropis. Sambiloto merupakan tanaman asli India dan Cina. Tanaman ini banyak tumbuh di Asia Selatan bagian timur seperti India, Sri Lanka, Pakistan, dan juga termasuk Indonesia. Di Indonesia, tanaman ini banyak dijumpai di Jawa, Sumatra, Sulawesi, Kepulauan Nusa Tenggara, dan Kepulauan Maluku (Pujiasmanto dkk., 2007).

2.1.5 Kandungan kimia

Sambiloto mengandung flavonoid dan lakton. Komponen utama bentuk lakton adalah andrografolida yang merupakan zat aktif utama dari tanaman ini. Andrografolida sudah diisolasi dalam bentuk murni dan menunjukkan berbagai aktivitas farmakologi. Berdasarkan penelitian lain dilakukan kandungan yang dijumpai pada tanaman sambiloto antara lain diterpen lakton glikosidanya, seperti

Berdasarkan penelitian lain yang dilakukan, kandungan yang dijumpai pada tanaman sambiloto antara lain diterpen lakton glikosidanya, seperti deoksiandrografolida. Daun dan cabangnya lebih banyak mengandung lakton, sedangkan komponen flavonoid dapat diisolasi dari akarnya, yaitu polimetoksiflavin, andrografenin, panikulin, dan apigenin-7,4'-dimetileter. Selain komponen lakton dan flavonoid, tanaman sambiloto juga mengandung kalsium, natrium, dan kalium.

2.1.6 Khasiat dan Kegunaan

Kegunaan dari sambiloto yang didukung oleh data klinis antara lain sebagai profilaksis dan pengobatan gejala infeksi pernafasan atas, seperti flu dan sinusitis, bronchitis, dan faringotonsilitis, infeksi saluran kemih, dan diare akut. Sedangkan, penggunaan sambiloto untuk pengobatan tradisional meliputi

pengobatan disentri basiler, colitis, batuk, dyspepsia, demam, hepatitis, malaria, ulser pada mulut, luka, tuberculosis, gigitan ular berbisa, otitis media, vaginitis, penyakit radang panggul, cacar air, eksim, dan luka bakar (World Health Organisation, 2002).

Aktivitas biologis lain dari sambiloto antara lain sebagai antimikroba, antifungi, antihipertensi, antiinflamasi, antitrombin, analgesic, antipiretik, hipoglikemik, antispasmodik, antifertilitas, teratogenik, antitumor, hepatoprotektif, sitoksik, antileishmaniasis, stimulant pertumbuhan rambut, antiHIV, pengobatan sindrom nefrotik, koleretik, perlindungan membran eritrosit, aktivitas kardiovaskular, antialergi, antiplatelet, antiflu, dan induksi fagositosis (Kardono, Artanti, dewiyanti dan Basuki, 2003).

2.1.7 Kandungan Sambiloto Terhadap Immunostimulator

Sambiloto mengandung berbagai bahan, salah satunya andrographolide. Zat ini meningkatkan induksi sel-sel mononuclear darah tepi terhadap *tumor necrosis factor* (TNF)- α , interferon (IFN)- α , dan (IFN)- γ , meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal pada babi terhadap eritrosit ayam, serta meningkatkan toksisitas yang dimediasi sel NK dari sel-sel mononuclear darah tepi untuk merusak sel Kanker. Hasil tersebut menunjukkan bahwa andrographolide dapat bertindak sebagai imunostimulan yang mampu menstimulasi baik fungsi kekebalan spesifik maupun tidak spesifik melalui sel NK, makrofag, dan induksi sitokin (Jarukarmjorn dan Nemoto, 2008).

Ekstrak dari andrographolide murni telah terbukti mampu menstimulasi respon kekebalan bawaan pada mencit. Kemampuan imunostimulator andrographolide disebut berhubungan dengan peningkatan proliferasi limfosit pada

darah tepi manusia dan produksi sitokin utama serta ekspresi activator kekebalan misalnya IFN- γ , neopterin, dan β -2-microglobulin pada kultur darah *in vitro* (Panossian *et al.*, 2002 dalam Xu, 2009).

Komponen aktif dari daun sambiloto (*A.paniculata* Nees.) yang diisolasi dari pelarut etanol mempunyai efek imunostimulator dan dapat menghambat induksi sel penyebab HIV. Komponen tersebut meningkatkan proliferasi dan induksi IL-2 limfosit perifer darah manusia (Kumar *et al.* dalam Elfahmi, 2007). Bahkan dalam Torre *et al.* yang dikutip oleh Zein (2009) menyatakan bahwa terhadap sel limfosit yang diisolasi dari limpa, kandungan komponen aktif ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata* Nees.) dapat meningkatkan aktifitas proliferasinya, sehingga ekstrak sambiloto (*A. paniculata* Nees.) disebut sebagai imunostimulator.

2.2 Imunostimulator

Imunostimulasi merupakan bagian dari cara kerja imunomodulator yang dipandang sebagai bagian terpenting dalam dunia pengobatan. Imunomodulator adalah bahan (obat) yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun. Substansi baik biologis maupun sintetisnya dapat menstimulasi, menekan atau mengatur salah satu dari komponen sistem kekebalan, baik respon kekebalan spesifik maupun non spesifik (Agrawal dan Singh, 1999). Cara kerja imunomodulator meliputi: 1) mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu (imunrestorasi); 2) memperbaiki fungsi sistem imun (imunostimulasi); 3) menekan respon imun (imunosupresi) (Suhirman dan Winarti, 2007).

Imunostimulator berhubungan dengan peningkatan respon imun spesifik atau non spesifik. Beberapa bahan yang mampu memacu peningkatan respon imun disebut imunostimulator. Beberapa senyawa kimia yang dapat meningkatkan

aktivitas sistem imun sangat membantu untuk mengatasi penurunan sistem imun dan senyawa-senyawa tersebut dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan. Jenis tumbuhan yang dideteksi berkhasiat sebagai imunostimulator adalah tanaman sambiloto (*Apaniculata*) (Mills dan Bone, 2000; Ebadi, 2002).

2.3 Sistem Imun

Sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh, guna melindungi tubuh dari berbagai ancaman seperti mikroorganisme penyebab infeksi. Sistem imun mempunyai sedikitnya 3 fungsi utama. Fungsi pertama adalah suatu fungsi yang sangat spesifik yaitu kesanggupan untuk mengenal dan membedakan berbagai molekul target sasaran dan juga mempunyai respon yang spesifik. Fungsi kedua adalah kesanggupan membedakan antara antigen diri dan antigen asing. Fungsi ketiga adalah fungsi memori yaitu kesanggupan melalui pengalaman kontak sebelumnya dengan zat asing patogen untuk bereaksi lebih cepat dan lebih kuat daripada kontak pertama (Baratawidjaja, 2006).

Sistem imun di dalam tubuh dibedakan menjadi 2 macam yaitu sistem imun alamiah (*non-specific/innate immunity*) dan sistem imun adaptif (*specific/adaptive immunity*). Masing-masing sistem imun tersebut mempunyai sel-sel dan organ yang berperan dalam mengeliminasi mikroorganisme yang menyerang tubuh. Sistem imun alamiah merupakan pertahanan terdepan yang mencegah mikroba masuk dan dengan cepat menyingkirkan mikroba tersebut. Pertahanan ini tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu, artinya mekanisme pertahanan tidak ditujukan hanya untuk satu jenis antigen, tetapi untuk berbagai jenis antigen. Imunitas alamiah ini telah ada sejak bayi lahir dan terdiri atas berbagai macam elemen non-spesifik. Jadi bukan merupakan pertahanan khusus untuk antigen tertentu. Lain halnya dengan

sistem imun alamiah, sistem imun adaptif/spesifik hanya dapat menyingkirkan benda asing yang sudah dikenal sebelumnya dan mekanisme pertahanan ditujukan khusus untuk satu jenis antigen saja, dan dapat menimbulkan memori imunologis. Pertahanan tubuh spesifik akan terbentuk setelah ia kontak dan ditimbulkan terlebih dahulu oleh antigen tertentu. Sistem imun spesifik ini akan berfungsi ketika sistem pertahanan alami sudah tidak efektif atau bahkan tidak mampu dalam menyingkirkan mikroorganisme yang terinfeksi ke dalam tubuh. Sistem imun spesifik dapat bekerja tanpa bantuan sistem imun non-spesifik, tetapi umumnya terjalin kerjasama antara antibodi, komplemen, fagosit, sel T, dan makrofag (Baratawidjaja, 2006).

Saat peran fagosit dalam respon imun alami terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, maka respon imun spesifik akan teraktivasi oleh antigen *Salmonella*. Menurut Xu (2009) dan Baratawidjaja (2000) sel yang berperan dalam sistem imun non-spesifik dan sistem imun spesifik dalam mekanisme kerja imunitas seluler adalah: 1) sistem imun non-spesifik yaitu terdiri dari sel fagosit PMN (neutrofil, eosinofil, basofil) dan MN (monosit/makrofag, limfosit) serta sel NK; 2) sistem imun spesifik yaitu sel limfosit (sel T dan sel B).

2.4.1 Sistem imun spesifik

Sistem imun spesifik adalah baris pertahanan kedua dari tubuh makhluk hidup dan memerlukan waktu untuk dapat bekerja mengatasi serangan mikroorganisme dengan cara mengenalinya terlebih dahulu. Sistem imun spesifik terdiri atas sistem imun spesifik humoral yang diperankan oleh limfosit B atau sel B dan sistem imun spesifik seluler yang diperankan oleh limfosit T atau sel T. Sistem imun spesifik memiliki kemampuan mengingat “memori” terhadap

mikroorganisme yang pernah dikenalnya sehingga akan bekerja lebih cepat (Tizard, 2008).

2.4.2 Sistem Imun Non spesifik

Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh alamiah yang pertama mengatasi serangan mikroorganisme yaitu barrier fisik berupa kulit. Pada bagian lain dari tubuh yaitu saluran pencernaan memiliki mekanisme tersendiri dalam peranannya mengatasi infeksi mikroba yaitu batuk, bersin, muntah, diare serta ekskresi urine (Tizard, 2008).

Tubuh makhluk hidup juga memiliki pertahanan biokimia yang disekresikan baik berupa pH asam dari keringat dan sekresi sebaceous yang bisa mendenaturasi membrane sel dari agen pathogen. Selain itu, di ludah, air mata, dan air susu juga terdapat lisozim yang bisa melisiskan peptidoglikan dinding sel bakteri. Serum darah makhluk hidup juga terdapat laktoferin dan transferrin yang dapat mengikat zat bakteri yang merupakan metabolit esensial bagi beberapa jenis mikroba. Pertahanan humoral diperoleh dari dalam cairan tubuh dan diperantai oleh antibodi dan komplemen. Adapun pertahanan humoral yang bersifat non spesifik diperankan oleh sel fagosit, makrofag, sel NK, dan sel mast. Sistem pertahanan tubuh yang bersifat alamiah akan langsung bekerja jika terjadi serangan dari mikroorganisme tanpa harus mengenalinya terlebih dahulu (Tizard, 2008).

2.5 Interferon Gamma (IFN)- γ

Interferon Gamma (IFN)- γ pada dasarnya adalah sitokin yang berperan dalam aktivasi makrofag dan melayani fungsi penting dalam sel-sel yang termediasi imunitas alami dan adaptif. Interferon gamma memiliki fungsi utama sebagai

sitokin efektor pada respon imunitas. Struktur IFN- γ adalah protein homodimer yang diproduksi oleh sel NK dan sel Th. Interferon gamma diproduksi oleh sel Th dan berperan dalam meningkatkan aktivitas *mycobactericidal* pada makrofag terhadap kontrol replikasi *Mycobacterium tuberculosis* (Jang *et al.*, 2008). Selain itu IFN- γ berperan penting dalam aktivasi APC memicu terhadap aktivasi respon seluler antibakteri dan meningkatkan induksi respon limfosit antibakteri (Sctrichman dan Samuel, 2001).

Beberapa fungsi dari IFN- γ yang berperan dalam melawan mikroba intraseluler yang meliputi sebagai sitokin yang mengaktifasi makrofag, menstimulasi ekspresi *major histocompatibility complex* (MHC) kelas 1 dan 2, mempromosikan diferensiasi sel Th menjadi sel Th1 dan mengaktifasi sel B dalam memproduksi antibody, dan mengaktifasi neutrofil serta aktivitas sitolisis sel NK (Abbas dan Lichtman, 2005). Interferon gamma berperan sebagai mediator kunci pada imunitas seluler Th1 dan mutlak diperlukan untuk imunitas yang efektif melawan pathogen intraseluler termasuk *mycobacteria* (Sctrichman dan Samuel, 2001).

2.6 *Salmonella thypimurium*

Klasifikasi *S. thypimurium* menurut Quinn *et al.* (2002) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*
 Phylum : *Proteobacteria*
 Class : *Gamma Proteobacteria*
 Ordo : *Salmonellales*
 Family : *Salmonellaceae*
 Genus : *Salmonella*

Spesies : *Salmonella thypimurium*

Penamaan yang benar adalah *S. enterica* subgrup enteric serotip *typhimurium*, ataupun sering dipersingkat dengan *S. enteric ser. typhimurium*. Namun penamaan *S.typhimurium* telah umum digunakan karena lebih sederhana (Sunanti, 2007).

2.5.2 Morfologi *Salmonella typhimurium*



Gambar 2.2 *S.typhimurium* (Hasil uji mikroskopis perbesaran 1000x dengan pewarnaan Gram di BBLK Surabaya pada 5 Maret 2015).

S.typhimurium merupakan bakteri patogen Gram negatif yang berbentuk batang dan memiliki flagella peritrikus sehingga bersifat motil. Bakteri ini memiliki diameter 0,7 – 1,5 μm dengan panjang 2 -5 μm , fakultatif anaerob, serta tidak membentuk spora. Suhu optimum pertumbuhannya adalah 35 – 37° C (D' Aoust, 2000).

2.5.3 Patogenesis penyakit

Habitat bakteri *Salmonella* adalah di dalam alat pencernaan manusia, hewan, dan bangsa burung. Oleh karena itu cara penularannya adalah melalui mulut karena makan/minum bahan yang tercemar oleh keluaran alat pencernaan

penderita. *Salmonella* akan berkembang biak di dalam alat pencernaan penderita, sehingga terjadi radang usus (enteritis). Radang usus serta penghancuran *lamina propria* alat pencernaan oleh penyusupan (proliferasi) salmonella inilah yang menimbulkan diare, karena salmonella menghasilkan racun yang disebut *cytotoxin* dan *enterotoxin* (Dharmojono, 2001). *Cytotoxin* merupakan racun atau antibodi yang memiliki tindakan racun tertentu pada sel-sel dari organ tertentu. Sedangkan *enterotoxin* adalah toksin yang menyebabkan usus halus mengeluarkan sekresi cairan yang berlebihan sehingga menyebabkan adanya gangguan seperti diare dan muntah-muntah (Madigan *et al.*, 2008).

Salmonella typhimurium memiliki beberapa faktor patogenitas, yaitu: (1) Daya invasi: Bakteri *Salmonella* di usus halus melakukan penetrasi ke dalam epitel. Setelah penetrasi organisme difagosit oleh makrofag, berkembang biak, dan dibawa oleh makrofag ke organ tubuh lain, (2) Antigen Permukaan: Kemampuan bakteri *Salmonella* untuk hidup intraseluler mungkin disebabkan oleh adanya antigen permukaan, (3) Endotoksin: Banyak manifestasi toksik yang disebabkan oleh infeksi bakteri gram-negatif disebabkan oleh endotoksin, (4) Enterotoksin: beberapa spesies *Salmonella* memproduksi endotoksin yang serupa dengan enterotoksin yang dihasilkan oleh *Enterotoksigenic E. coli (ETEC)* baik yang termolabil maupun yang termotabil (Kasno dkk., 2000).

2.5.4 Gejala Klinis

Diagnosis salmonellosis didasarkan pada gejala dan tanda klinis berupa demam, diare hebat dehidrasi dan lain-lain, kalau dilakukan pemeriksaan laboratorium untuk menemukan dan mengidentifikasi adanya bakteri *Salmonella*.

Gejala klinis menciit yang telah terinfeksi *S.typhimurium* yang lazim ditimbulkan antara lain diare, berat badan turun, lesu, bulu kasar, mortalitas berbeda-beda tergantung pada galur menciit (Pantas, 2009).

2.5.5 Respon Imun terhadap Bakteri *Salmonella typhimurium*

Respon imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel imunokompeten, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Pada umumnya terjalin kerjasama yang baik antara sistem imun non-spesifik dan sistem imun spesifik dalam mengeliminir bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Apabila sistem imun non-spesifik tidak mampu mengeliminir adanya bakteri yang masuk ke dalam tubuh maka diperlukan adanya kerja dari sistem imun spesifik. Aktivitas sel PMN dan MN akan menurun dan makrofag merupakan sel MN yang akan bertindak sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) kepada sel Th setelah terjadi adanya kontak dengan bakteri, hal inilah yang mengakibatkan akumulasi limfosit dalam jaringan darah semakin meningkat dibandingkan saat kondisi tubuh dalam keadaan sehat (Baratawidjaja, 2006).

S.typhimurium merupakan mikroorganisme fakultatif intraseluler yang dapat hidup bahkan berkembang biak dalam makrofag, tahan terhadap enzim-enzim di lisosom, mempunyai kemampuan untuk mencegah dan menghambat fusi fagolisosom sehingga sulit untuk dibunuh. Salah satu cara untuk membunuh kuman ini adalah dengan memacu fungsi makrofag untuk menghancurkan dan mengeliminasi bakteri tersebut (Kresno 2001; Abbas and Lichmant 2003).

Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing lainnya. Makrofag mampu menghancurkan bakteri yang terfagosit dengan membentuk

fagolisosom. Bakteri intraseluler seperti *S.typhimurium* yang difagosit makrofag kemungkinan selamat dari jeratan fagosom, sehingga dalam hal ini makrofag akan bertindak sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) yang akan menyajikan antigen kepada sel Th (sel T helper) yang mempunyai reseptor MHC II pada permukaan sel. Infeksi *S.typhimurium* tidak hanya mempengaruhi sel-sel sistem imun alamiah (*non-specific/innate immunity*) selama infeksi awal, tetapi juga sel limfosit T. Jumlah limfosit dalam sirkulasi darah menentukan kualitas aktivitas sistem imun (Shirwan *et al.* dalam Susanti dkk., 2012).

2.6 Pengenceran Bakteri

Pengenceran bakteri merupakan proses pembuatan suspensi kuman untuk menurunkan atau memperkecil konsentrasi larutan dengan cara memasukkan beberapa koloni kuman ke dalam zat pelarut untuk mengurangi kepadatan bakteri yang ditanam sehingga lebih mudah penanganannya (Nurohaianah, 2007).

Pelarut yang digunakan adalah NaCl fisiologis. Di dalam laboratorium, pengenceran dilakukan dengan botol pengenceran seperti lazimnya pada SPC, namun dapat pula menggunakan tabung reaksi. Pada pengenceran dengan menggunakan botol, cairan terlebih dahulu dikocok dengan baik sehingga kelompok sel dapat terpisah. Pengenceran sel dapat membantu untuk memperoleh perhitungan jumlah mikroorganisme yang benar (Hadioetomo, 1993). Metode pengenceran yang paling mudah adalah dengan melakukan pengenceran 10 kali lipat dengan menggunakan 3 atau 5 tabung pengenceran sekaligus (Fardiaz, 1992).

2.7 Uji Imunohistokimia

Uji Imunohistokimia gabungan antara histologi atau sirologi dan imunologi yang merupakan uji diagnostik yang sangat potensial untuk memeriksa antigen

secara local di jaringan dan sel yang menggunakan antibody monoclonal dan dapat digunakan dalam berbagai penelitian. Pemeriksaan imunohistokimia mempunyai kemampuan yang tinggi untuk memisahkan, menseleksi, dan bersifat spesifik. Pemeriksaan imunohistokimia untuk mendeteksi adanya antigen seluler yang menggunakan prinsip ikatan antigen-antibodi yang ditandai dengan penanda atau *marker* yang dapat divisualisasikan dengan mikroskop cahaya (Nurhidayat, 2002; Ambarsari, 2003; Rantam, 2003).

Antibodi yang baik digunakan dalam pemeriksaan imunohistokimia adalah antibody monoclonal murni yang mengandung satu jenis antibody untuk satu sisi antigenic (epitop) yang khas dari antigen tersebut sehingga tidak memungkinkan adanya reaksi silang dengan antigen yang lain (Nurhidayat, 2002). Uji imunohistokimia dapat dilakukan melalui direct dan indirect. Metode direct merupakan metode langsung menggunakan satu antibody yang berlabel sedangkan metode indirect menggunakan dua antibody (primer dan sekunder). Antibodi sekunder merupakan antibody yang dilabel dengan penanda (marker) yang dapat memvisualisasikan keberadaan antigen (Rantam, 2003; Ramos-Vara, 2005).

Teknik yang digunakan dalam uji imunohistokimia secara umum adalah metode *avidin-biotin complex*. Teknik uji imunohistokimia menggunakan prinsip avidin atau streptavidin yang berafinitas tinggi untuk biotin dan memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan teknik *peroksidase-anti peroksidase* (PAP) (Rantam, 2003). Metode *avidin-biotin complex* adalah prosedur dimana antigen akan terikat dengan antibody dalam dua tahap. Antibodi primer akan berikatan secara langsung dengan antigen, selanjutnya antibody primer berikatan dengan antibody sekunder yang telah mengalami biotinilasi. Pada setiap tangan antibody sekunder yang telah

terkonjugasi dengan biotin yang dapat berikatan dengan molekul avidin yang berfungsi sebagai penanda molekul berbiotin (Nurhidayat, 2002).

2.8 Mencit

Mencit merupakan hewan yang paling umum digunakan pada penelitian laboratorium sebagai hewan percobaan, yaitu sekitar 40-80 %. Mencit memiliki banyak keunggulan sebagai hewan percobaan, yaitu siklus hidup yang relative pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganannya.

Menurut Gardner *et al.* (2003), taksonomi dari mencit adalah sebagai berikut:

| | |
|-----------|-----------------------|
| Kingdom | : <i>Animalia</i> |
| Filum | : <i>Chordata</i> |
| Sub Filum | : <i>Vertebrata</i> |
| Kelas | : <i>Mamalia</i> |
| Sub kelas | : <i>Theria</i> |
| Ordo | : <i>Rodentia</i> |
| Sub ordo | : <i>Myomorpha</i> |
| Famili | : <i>Muridae</i> |
| Sub famil | : <i>Murinae</i> |
| Genus | : <i>Mus</i> |
| Spesies | : <i>Mus musculus</i> |

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan mamalia hasil domestikasi dari mencit liar yang paling umum digunakan sebagai hewan coba di laboratorium. Mencit kerap digunakan karena memiliki banyak kelebihan sebagai hewan coba, yaitu strain yang tersedia cukup banyak, mudah dihandling dan harganya relative murah dibandingkan spesies yang lain (Schwiebert, 2007).

Performa reproduksi dari mencit sangat tinggi dengan jumlah anak yang banyak. Kekurangan penggunaan mencit sebagai hewan coba adalah ukurannya yang kecil, dan jumlah sampel yang bisa diambil dari tiap mencit sangat terbatas. Penggunaan mencit banyak dilakukan dalam penelitian bidang imunologi, embriologi, kanker, percobaan farmakologi dan toksikologi dan penyakit infeksius (Schwiebert, 2007).

BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan desember hingga januari 2015. Tempat pelaksanaan penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yaitu : di Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pembuatan ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.), Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Departemen Mikrobiologi Veteriner untuk pengenceran bakteri *Salmonella typhimurium*, dan Unit Kandang Hewan Coba untuk pemeliharaan hewan coba mencit, sedangkan pemeriksaan kadar interferon gamma dilakukan di Laboratorium Patologi Umum Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

3.2 Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah 25 ekor mencit putih (*Mus musculus*) dengan jenis kelamin jantan strain Balb/C berumur 2 – 3 bulan, berat badan sekitar 20–30 g. Hewan coba ini diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

Bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak sambiloto (*A.paniculata* Nees.) yang di peroleh dari kabupaten Bojonegoro. Bahan-bahan lain yang diperlukan dalam pembuatan ekstrak sambiloto (*A.paniculata* Nees.) antara lain etanol 96%, akuades steril, dan larutan CMC Na 0,5%. Bahan untuk pemeliharaan mencit berupa air minum (ad libitum) dan pakan hewan coba pakan ayam 511 berbentuk pellet (PT. Charoen Pokphan Surabaya).

Bahan lainnya adalah *S.thypimurium*, SSA (*Salmonella-Shigella* Agar) sebagai medium untuk pertumbuhan bakteri, sedangkan bahan untuk pengenceran bakteri *S. thypimurium* adalah larutan NaCl fisiologis, larutan Mc Farland 0,5 yang terdiri dari larutan BaCl₂ dan H₂SO₄.

Bahan untuk pembedahan antara lain alcohol 70%. Bahan untuk fiksasi jaringan larutan buffer formalin, alcohol 70% dan 96%, xylene, dan paraffin cair. Bahan untuk ulasan cairan peritoneum adalah methanol dan pewarnaan giemsa. Bahan kimia untuk sekresi IFN- γ dengan teknik imunohistokimia: antibody IFN- γ , mencit, PBS 10%, H₂O₂ 3%, antibody sekunder berlabel biotin, streptavidin[®], Diaminobenzidine (DAB), larutan *Hematoxylen Mayer*, Larutan TRIS dengan pH 7,4, *metal blue and green*, *blocking buffer ultra V block* (sigma-Aldrich), eter, aquades, dan NaCl fisiologis.

3.2.2 Alat penelitian

Alat yang diperlukan untuk hewan coba selama penelitian adalah kandang mencit beserta tempat pakan, tempat minum, dan alas kandang, spuit 1 cc, sonde, *disposable hand gloves*, beberapa pot kecil untuk menampung ekstrak sambiloto (*A. paniculata* Nees.) sesuai dosis.

Alat yang diperlukan dalam pembuatan ekstrak sambiloto (*A.paniculata* Nees.) adalah timbangan ohaus, blender, ayakan mesh ukuran 100, *beaker glass*, gelas ukur, baskom plastik, toples kaca, corong pisah, corong kaca, batang pengaduk, *rotavapor*, labu erlenmeyer, cawan porselen, pompa *vacuum*, penyaring *Buchner*

Alat yang digunakan untuk identifikasi dan pengenceran bakteri *S.typhimurium* adalah tabung reaksi 1 ml, cawan petri, pipet. Alat yang digunakan

untuk pembedahan mencit adalah Dissecting set dan papan seksi. Alat yang digunakan untuk IFN- γ menggunakan mikroskop Olympus® CX-41.

3.3 Metode Penelitian

3.1.2 Pembuatan simplisia daun sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Bahan baku tanaman sambiloto (*A.paniculata* Nees.) diperoleh dari kabupaten Bojonegoro, sebanyak 7 kg daun sambiloto. Daun sambiloto yang masih segar dilakukan sortasi basah dengan cara daun sambiloto dipisahkan dari berbagai kotoran atau bahan asing lainnya agar bebas dari hama, batang dan debu, serta pengotor lainnya. Setelah itu dilakukan penimbangan terhadap berat basah. Setelah ditimbang, daun sambiloto dicuci dengan menggunakan air mengalir sampai bersih, kemudian dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil untuk mempermudah proses pengeringan, lalu dikeringkan di dalam ruangan tertutup dengan suhu kamar dan kelembapan normal. Pengeringan tidak dilakukan di bawah sinar matahari secara langsung dengan tujuan untuk menghindari kerusakan senyawa kimia dalam daun sambiloto oleh sinar matahari. Setelah kering, daun sambiloto dipisahkan dari benda-benda asing seperti bagian tanamanyang tidak diinginkan dan pengotor lainnya. Lalu dilakukan penimbangan terhadap berat kering untuk mengetahui susutnya berat setelah pengeringan. Daun sambiloto dibuat serbuk dengan cara diblender sampai halus dan diayak dengan ayakan mesh ukuran 100. Setelah itu ditimbang lagi. Dari 7 kg daun sambiloto, diperoleh 1,5 kg serbuk sambiloto.

3.1.3 Pembuatan ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

Pembuatan ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata* Nees.) menggunakan metode maserasi. Serbuk sambiloto dilakukan maserasi dengan menggunakan

pelarut etanol 96 % yang dilakukan berulang kali sampai hasil cairan terlihat bening. Pada maserasi pertama sebanyak 1,5 kg serbuk kering simplisia diberi pelarut etanol sebanyak 3 L. Maserasi dilakukan selama 1 - 2 hari dalam ruangan yang terlindung dari cahaya matahari dan dilakukan pengadukan secara berkala. Ekstrak yang diperoleh dilakukan penyaringan yang dibantu dengan pompa *vacuum*, hasil dari maserat tersebut diuapkan dengan rotavapor pada suhu 50-55° C dengan kecepatan 40 rpm sehingga diperoleh hasil ekstrak kental. Cairan kental dari daun sambiloto disebut dengan ekstrak etanol daun sambiloto. Dari 1500 gram berat serbuk herba sambiloto diperoleh ekstrak daun sambiloto sebanyak 85 gram.

3.1.4 Dosis konversi ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

Berdasarkan dari beberapa penelitian, sambiloto digunakan untuk memperbaiki kondisi tubuh dalam bentuk sediaan serbuk/bubuk yang dimasukkan dalam kapsul digunakan dengan dosis 500 mg dipakai dalam 3 kali sehari atau 1500 mg/hari (BB orang Indonesia rata-rata 50 kg). Dosis obat yang dipakai pada manusia dengan berat badan 70 kg dikonversikan ke mencit dengan berat badan 20 gr dikalikan faktor konversi 0,0026. Sehingga dosis ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata* Nees.) pada mencit BB 20 g adalah $1500 \text{ mg} \times 70/50 \times 0,0026 = 5,46 \text{ mg}/20 \text{ mg BB/hari}$. Berdasarkan Wagner and Wolff (1976), dasar perhitungan dosis hewan ED₅₀ yang digunakan untuk penelitian diperoleh $\log 5,46 = 0,74$. Log ini berada di antara log 3 yaitu 0,48 dan log 10 yaitu 1. Masing-masing dosis dibuat sediaan suspensi dengan menggunakan CMC Na 0,5% sebanyak 0,5 ml sebagai suspensator, dan diberikan pada mencit secara peroral. Konversi perhitungan dosis dapat dilihat pada lampiran 2.

3.1.5 Identifikasi bakteri *Salmonella typhimurium*

Bakteri *S.typhimurium* yang diperoleh dari Laboratorium Pengujian Farmasi Universitas Airlangga Surabaya telah dilakukan proses pembaruan bakteri dalam media Nutrient Agar Slant sebelum dilakukan identifikasi lebih lanjut, dengan cara bakteri diambil satu ose lalu dimasukkan ke dalam *Trypticase Soy Broth* (TSB) dan diinkubasi selama satu jam, lalu masukkan ose ke dalam *Trypticase Soy Broth* (TSB) dan *streak* pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS) iinkubasi selama 1x24 jam. Bakteri yang sudah dilakukan pembaruan selanjutnya dalam waktu kurang dari 24 jam isolat bakteri segera dibawa ke Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya, Laboratorium Mikrobiologi untuk dilakukan identifikasi menggunakan alat BD Phoenix – *Instrument Version 6.01A Automatic Microbiologic System*. Selain menggunakan alat tersebut, juga dilakukan beberapa identifikasi bakteri berdasarkan identifikasi standar Mikrobiologi Kedokteran, yaitu dengan uji mikroskopis dengan pewarnaan Gram, uji reaksi biokimia yang meliputi KIA (Kliger Iron Agar), IMVIC (Indol-Metil red-Voges proskauer-Citrate), indol *motility*, urea agar, lisin; uji gula-gula yang meliputi glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manosa; dan yang terakhir adalah uji serologik dengan menggunakan antisera.

3.1.6 Pengenceran bakteri *Salmonella typhimurium*

Pengenceran bakteri menggunakan larutan NaCl fisiologis, mula-mula disetarakan dengan pengenceran Mc Farland standart 0,5 (setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml) pada sebuah tabung menggunakan alat DENSI CHEK. Tabung tersebut ditambahkan 2,5 ml NACL fisiologis dan dihomogenkan sehingga diperoleh 10^8 CFU/ml. Dari tabung tersebut diambil dengan menggunakan spuit 0,5 ml dan

dimasukkan kedalam tabung yang berisi NaCL fisiologis 4,5 ml lalu dihomgenkan, dicatat sebagai 10^7 . Begitu seterusnya hingga pada tabung yang dicatat sebagai 10^5 .

3.1.7 Infeksi bakteri *Salmonella typhimurium*

Bakteri *S.typhimurium* akan diinfeksi ke dalam tubuh mencit setelah mencit melewati masa adaptasi selama satu minggu. Bakteri tersebut diinokulasikan ke dalam tubuh mencit secara intraperitoneal 0,5 ml suspensi bakteri *S.typhimurium* yang telah diencerkan. Dosis kuman yang digunakan ke dalam tubuh mencit adalah 10^5 sel/0,5 ml. Dosis tersebut diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Gamasinta (2015) di mana respon makrofag yang aktif sebesar 50% terletak pada dosis kuman 10^5 sel/0,5 ml.

3.1.8 Prosedur pemeriksaan ekspresi IFN- γ pada organ limpa dengan metode imunohistokimia.

Prosedur pewarnaan IHK pada penelitian ini menggunakan protokol IHK paraffin dari cell signaling technology (2007). Metode tersebut meliputi tiga langkah utama yang meliputi deparaffinisasi (rehidrasi), antigen unmasking dan pewarnaan (staining). Berikut ini adalah langkah-langkah pelaksanaannya.

1. Deparaffinisasi (rehidrasi)

Langkah diawali proses inkubasi dengan menginkubasi jaringan pada gelas objek dalam larutan xylol sebanyak tiga kali, masing-masing selama 10 menit. Selanjutnya diinkubasi jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat, mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah. Konsentrasi etanol digunakan adalah 100, 96, 80, dan 70 % masing-masing dilakukan sebanyak dua kali selama 10 menit. Proses deparaffinisasi diakhiri dengan inkubasi jaringan dalam akuades sebanyak dua kali, masing-masing selama 5 menit.

2. Antigen *Unmasking*

Antigen unmasking bertujuan untuk membuka epitope antigen, sehingga antigen dapat berikatan dengan antibody. Antigen unmasking dilakukan dengan merebus jaringan dalam 10 mM larutan PBST (buffer natrium sitrat) pada suhu 85derajat celcius selama 10 menit. Buffer natrium sitrat dengan melarutkan 2,49 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ dalam 1liter akuades.

3. Pewarnaan (*Staining*)

Proses pewarnaan (*staining*) dilakukan setelah proses pendinginan pada antigen unmasking. Pewarnaan diawali dengan jaringan diinkubasi. Pada gelas objek dengan OBS. Selanjutnya ditetesi dengan larutan 3% H_2O_2 (Hidrogen Peroksida) selama 20 menit. Setelah itu, ditetesi dengan larutan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. PBS berperan sebagai larutan pencuci (wash buffer). Pembuatan PBS, ditambahkan Tween 20 sebanyak satu tetes. Tween 20 berperan sebagai deterjen, yaitu untuk menyatukan protein-protein lain yang bukan target, sehingga memperjelas pengamatan protein target.

Inkubasi dilanjutkan di dalam larutan blocking (blocking solution) selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan blocking dibuat dengan cara melarutkan susu skim (skim milk) ke dalam PBS, dengan perbandingan 0,1 g susu skim dalam 100 ml PBS. Larutan blocking sebanyak 100-400 μL ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet, selanjutna ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Tahapan selanjutnya adalah inkubasi jaringan dalam larutan antibodi primer pada suhu 4°C selama semalam. Antibodi primer (1:2500) sebanyak 100-400 μL ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet. Inkubasi ini bertujuan

mengefektifkan reaksi antara antibody primer yang sudah terikat pada jaringan dengan antibody sekunder (reaksi Ag-Ab), selanjutnya ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Pada penelitian ini, antibody sekunder yang digunakan adalah antibody anti rabbit yang dilabel dengan enzim SA-HRP (Strep avidin horseradish peroxidase) selama 60 menit. Selanjutnya antibody sekunder dilarutkan dan dilanjutkan dengan menginkubasi jaringan dalam larutan PBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, jaringan diinkubasi dengan larutan DAB (diaminobenzidine) dengan pengenceran 1:1000 selama pada suhu ruang. DAB ini sebagai substrat bagi enzim SA-HRP. Reaksi antara DAB dan enzim SA-HRP menghasilkan warna coklat. Selanjutnya jaringan ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, jaringan diinkubasi dengan larutan hematoksilin selama 5-10 menit pada suhu ruang.

Inkubasi jaringan dilanjutkan dalam akuades sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit. Setelah inkubasi dengan akuades, langkah penting lain dalam metode imunohistokimia yang termasuk ke dalam pewarnaan staining adalah dehidrasi, penjernihan dan penutupan jaringan pada gelas objek (mounting) (Panigoro, 2007, cell signaling technology).

Proses dehidrasi dilakukan dengan menginkubasi jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat. Setelah inkubasi dalam etanol 100%, selanjutnya adalah mounting dengan cara jaringan diinkubasi dalam xylol selama 3 menit. Selanjutnya jaringan siap ditup dengan objek glass. Sediaan histologis siap diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Perubahan histopatologi yang terlihat pada jaringan berdasarkan pewarnaan IHK dikelompokkan berdasarkan dua parameter, yaitu rata-rata jumlah dot untuk warna coklat DAB yang terlokalisasi dan rata-rata tingkat kepekaan untuk DAB yang tidak terlokalisasi karena membentuk area berwarna coklat. Warna coklat DAB yang terlokalisasi dianalisis menggunakan imunoratio. Warna coklat DAB yang tidak terlokalisasi dihitung berdasarkan analisis semikuantitatif. Hal ini dilakukan dengan memberikan skor terhadap tingkat kepekaan warna coklat pada area yang terbentuk (Kanter, 2004 yang dimodifikasi Suja, 2009 yang dimodifikasi).

Tabel 3.1 Skala semikuantitatif IRS (Indeks Skala Remmele/Immuno Reactive Score) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intensitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$

| A | B |
|---|----------------------------------|
| Skor 0 : tidak ada sel positif | Skor 0 : tidak ada reaksi warna |
| Skor 1 : Sel positif kurang dari 10% | Skor 1 : Intensitas warna rendah |
| Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50% | Skor 2 : Intensitas warna sedang |
| Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80% | Skor 3 : Intensitas warna kuat |
| Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80% | |

Sumber: Novak *et al.*, 2007

Pemeriksaan histopatologi ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi interferon gamma pada sel-sel limfosit pada limpa. Ekspresi interferon gamma pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007), dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (tabel 1). Data

setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 1000x. Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar Nikkon Image System.

3.4 Rancangan Penelitian

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) yang dikelompokkan secara random menjadi lima kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol negatif (K-), dan 4 kelompok perlakuan (P). Semua media dan bahan percobaan maupun keadaan lingkungan dianggap seragam, sehingga hasil perbedaan antar perlakuan hanya disebabkan oleh pengaruh perlakuan dan pengaruh acak saja.

Berdasarkan *Research Guidelines for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines* dari WHO (1993), yaitu jumlah mencit pada tiap kelompok minimal 5 ekor. Dengan rumus ulangan $(n-1) (n-1) \geq 15$, sehingga dalam penelitian ini ditentukan 5 ulangan setiap masing-masing kelompok dengan jumlah total sampel sebanyak 25 ekor.

3.5 Variabel Penelitian

3.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi interferon gamma (IFN- γ) dengan metode imunohistokimia.

3.3.3 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sambiloto yang diberikan secara peroral pada mencit, dosis bakteri *S.typhimurium*.

3.3.4 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis kelamin mencit, umur, pakan, air minum, dan kondisi lingkungan mencit.

3.4 Prosedur Penelitian

Sebanyak 25 ekor mencit dikelompokkan secara random menjadi 5 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit dan diadaptasikan selama tujuh hari. Pembagian kelompok tersebut adalah sebagai berikut :

1. K (-) = Kelompok mencit ini tanpa diinfeksi *S.typhimurium* dan tanpa pemberian ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata*), hanya diberi CMC Na 0,5% sebanyak 0,5 ml.
2. P (0) = Kelompok mencit yang diinfeksi *S.typhimurium* 10^5 sel/ml, setelah melewati 7 hari diberi vehiculum CMC Na 0,5% sebanyak 0,5 ml.
3. P1 = Pada hari ke-8 kelompok mencit yang diinfeksi *S.typhimurium* 10^5 sel/0,5 ml, setelah melewati 7 hari masa inkubasi diberi terapi ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata*) dosis I yaitu 4,42 mg/20g BB/hari dan CMC Na 0,5% sebanyak 0,5 ml sebagai suspensor.
4. P2 = Pada hari ke-8 kelompok mencit yang diinfeksi *S.typhimurium* 10^5 sel/0,5 ml, setelah melewati 7 hari masa inkubasi diberi terapi ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata*) dosis II yaitu 6,82 mg/20g BB/hari dan CMC Na 0,5% sebanyak 0,5 ml sebagai suspensor.

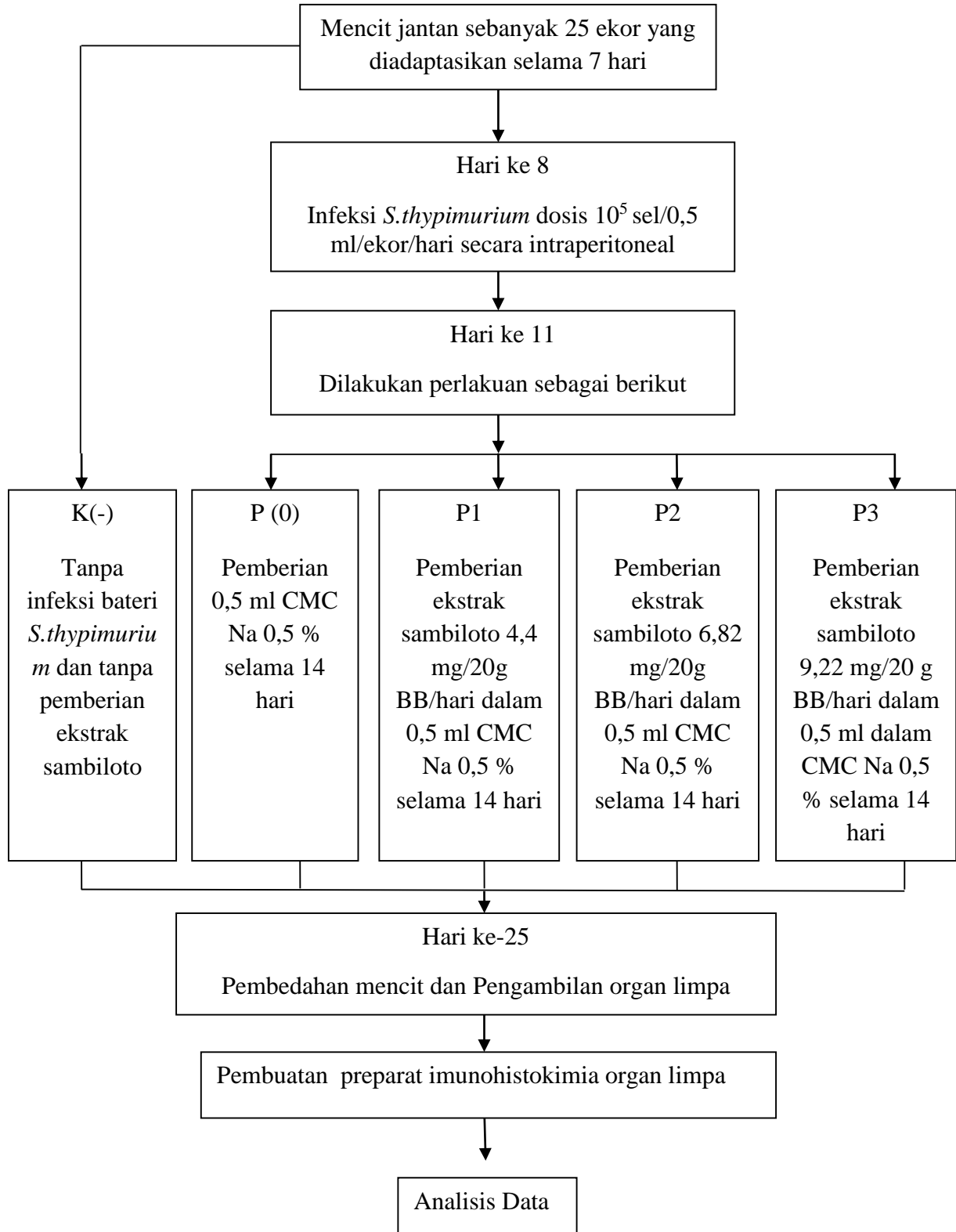
5. P3 = Pada hari ke-8 kelompok mencit yang diinfeksi *S.typhimurium* 10^5 sel/0,5 ml, setelah melewati 7 hari masa inkubasi diberi terapi ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata*) dosis III yaitu 9,22 mg/20g BB/hari dan CMC Na 0,5% sebanyak 0,5 ml sebagai suspensor.

Pemberian ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata*) dilakukan selama 14 hari. Setelah diberikan terapi selama 14 hari, dilakukan pembedahan untuk diambil organ limpa mencit.

3.5 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima kelompok percobaan, yaitu 1 kelompok kontrol negatif (K-) dan 4 kelompok perlakuan (P), dan lima ulangan pada setiap kelompok. Analisis data dilakukan dengan uji *Kruskal Wallis* di lanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat pengaruh ekstrak daun sambiloto (*A.paniculata* Nees.) sebagai imunostimulator terhadap ekspresi interferon gamma mencit yang diinfeksi *S.typhimurium*.

3.6 Kerangka Penelitian



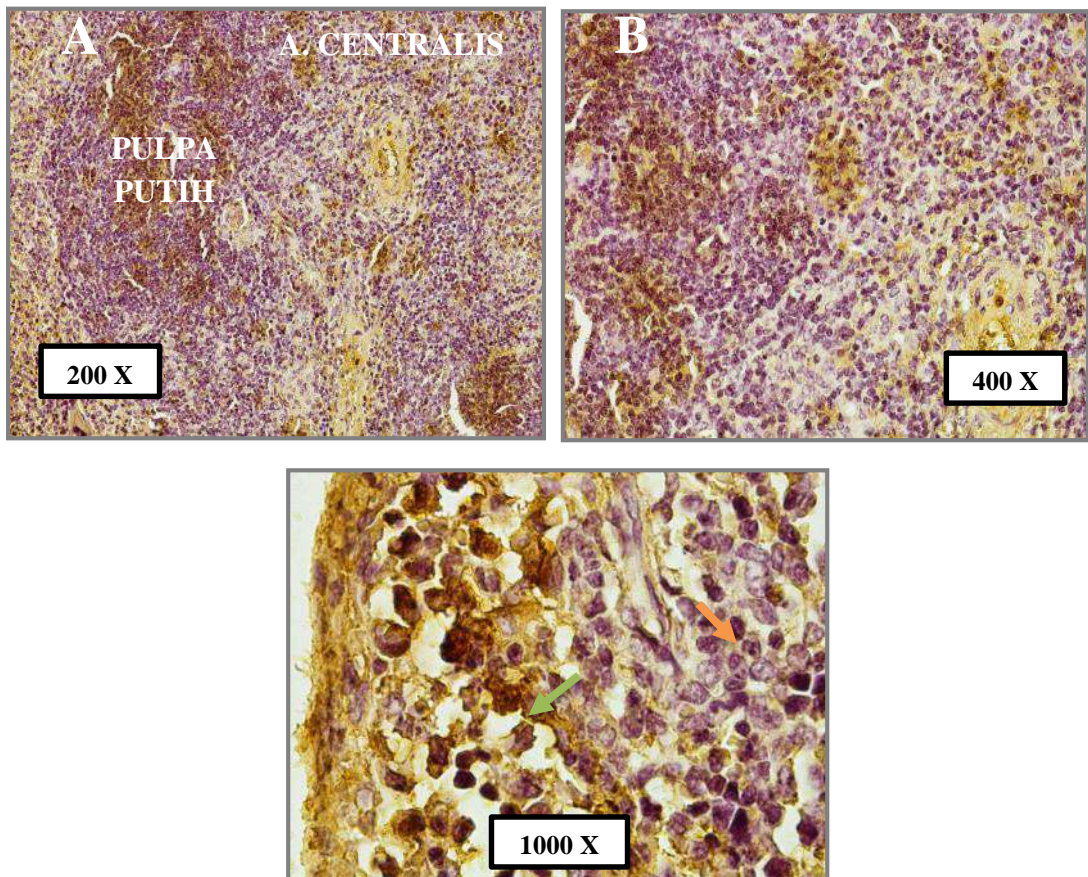
BAB 4 HASIL PENELITIAN

Pada bab ini memuat hasil penelitian yang sesuai dengan tujuan dan kerangka konseptual. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk foto atau gambar. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya Interferon Gamma (IFN- γ) pada limpa mencit dengan menggunakan teknik Imunohistokimia dan mengetahui adanya interaksi antara antigen dengan antibodi pada jaringan histopatologi limpa mencit (*Mus musculus*) dengan menggunakan teknik Imunohistokimia.

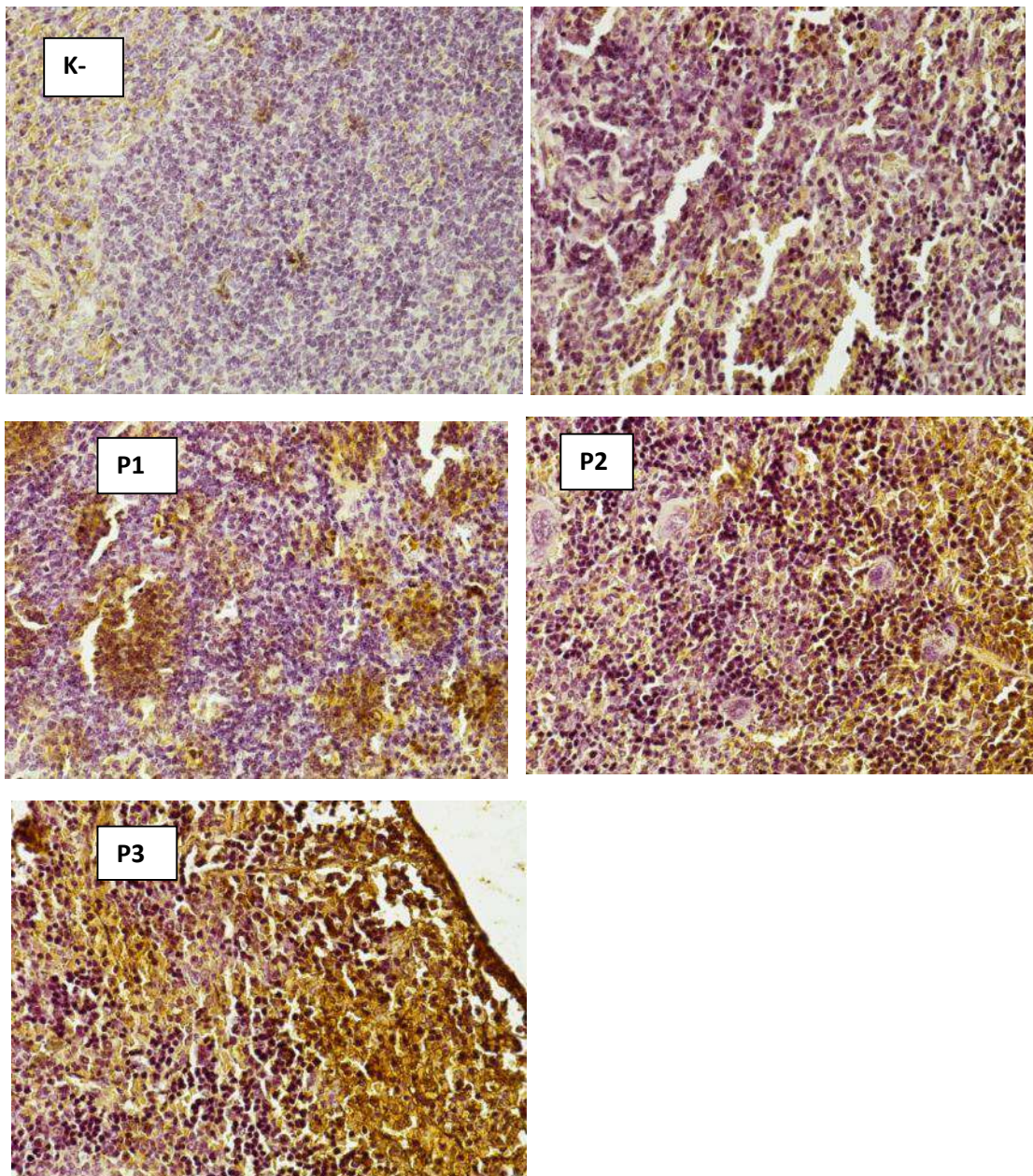
Hasil pemeriksaan preparat histopatologi limpa mencit dengan pewarnaan imunohistokimia dan diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x guna melihat adanya Interferon Gamma. Pada pemeriksaan tersebut didapatkan bahwa pada perlakuan P (1), P(2), dan (P3) yang di berikan dosis berbeda 4,42 mg, 6,82 mg, dan 9,22 mg menunjukkan produksi Interferon Gamma yang semakin meningkat terutama pada pemberian dosis tinggi. Hal ini terlihat dengan adanya warna kecoklatan pada jaringan histopatologi limpa mencit.

Hasil pada perlakuan pertama P(1) pada jaringan histopatologi terlihat adanya ikatan antara antigen dan antibodi yang tervisualisasi dengan warna kecoklatan pada preparat limpa. Sedangkan pada perlakuan kedua P(2) hasil pemeriksaan menunjukkan histopatologi menunjukkan bahwa kecoklatan lebih banyak dan menyebar. Dan perlakuan ketiga P(3) hasil pemeriksaan menunjukkan histopatologi menunjukkan bahwa kecoklatan lebih menyebar, lebih banyak merata di seluruh lapangan pandang preparat limpa mencit.

Preparat histopatologi limpa mencit dapat dilihat adanya Interferon gamma dengan metode Imunohistokimia. Adanya Interferon gamma pada jaringan histopatologi limpa mencit dapat tervisualisasi dengan warna kecoklatan. Warna kecoklatan merupakan hasil reaksi antara antigen yang berikatan dengan antibodi primer sekundernya. Hasil ekspresi dan produksi Interferon gamma pada jaringan histopatologi limpa mencit dapat dilihat pada Gambar:



Gambar 4.1. Ekspresi interferon gamma pada sel-sel limfosit. Sel-sel immunoreaktif positif nampak terwarnai coklat kromogen (panah hijau), seperti yang terlihat jelas pada slide C, dimana sel immunoreaktif negatif akan terwarnai kebiruan (panah oranye) (pewarnaan immunohistokimia, Pembesaran 200x; 400x dan 1000x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel)



Gambar 4.2 Perbandingan produksi interferon gamma pada sel-sel limfosit pada pulpa putih limpa mencit diantara perlakuan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi *IFN- γ* pada kelompok P3 sedikit lebih kuat dibandingkan kelompok terapi lainnya maupun kelompok kontrol, walaupun secara statistic tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) (pewarnaan immunohistokimia panah hijau: imunoreaktif positif, panah oranye: imunoreaktif negatif, pembesaran 200x; 400x dan 1000x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).

Hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) berpotensi sebagai imunostimulator pada mencit yang diinfeksi *Salmonella thypimurium*. Hal ini terbukti ekstrak sambiloto dapat meningkatkan ekspresi Interferon gamma pada semua dosis melalui pemeriksaan Imunohistokimia ditandai dengan hasil positif dengan adanya sitoplasma limfosit yang berwarna coklat.

Tabel 4.1 IRS (Indeks Skala Remmele/*Immuno Reactive Score*)

| Kelompok Perlakuan | Immuno Reactive Score (IRS) /5LP |
|--------------------|----------------------------------|
| | Mean \pm SD |
| K (-) | 3,2 \pm 1.0954 |
| P 0 | 5,6 \pm 3.3466 |
| P1 | 7,6 \pm 3.3615 |
| P2 | 8,6 \pm 3.5777 |
| P3 | 10,8 \pm 1.6432 |

Dari tabel 4.1 terlihat bahwa ekstrak etanol sambiloto dapat meningkatkan ekspresi IFN- γ secara nyata ($p < 0,05$), rata-rata antar dosis perlakuan cenderung meningkat . Perhitungan dilanjutkan dengan analisis post hoc dengan uji kruskal wallis (lampiran 2) didapatkan hasil bahwa peningkatan rata-rata kelompok P (3) lebih tinggi daripada peningkatan rata-rata kelompok P (2) maupun P (1) analisis ekspresi IFN- γ menggunakan uji Kruskal Wallis diperoleh hasil ekspresi IFN- γ yang signifikan ($p < 0,05$) yg berarti perlakuan memberikan pengaruh yang bermakna terhadap nilai ujinya. Pemberian terapi sambiloto dapat meningkatkan ekspresi IFN- γ . Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Anggraini (2012).

BAB 5 PEMBAHASAN

Perkembangan pengetahuan tentang respon imun seluler terhadap infeksi dan penyakit lain. Mendorong penelitian mengenai komponen yang dapat memengaruhi komunikasi (interaksi) antar sel. Diferensiasi sel-sel induk mesenkim (mesenchymal stem cell) pada kultur PBMC merupakan salah satu indikator terjadinya komunikasi antar sel (Tzianabos, 2000; rantam, 2005; Lutfi dkk., 2012). Morfologi sel induk mesenkim yang pipih dan memanjang dapat ditemukan dan terlihat jelas. Hasil penelitian Lutfi dkk (2012) menyimpulkan pada kultur sel tersebut telah terjadi komunikasi antar sel melalui jalur autokrin dan parakrin. Senyawa kimia dari daun sambiloto dapat merangsang sel untuk mengekspresikan $IFN\gamma$.

Sel T $CD4+$ yang diaktifkan akan berdiferensiasi tergantung jenis stimulan (sitokin) yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Sitokin Th1 yang paling penting dihasilkan dalam fase efektor adalah $IFN\gamma$. Aktivitas fagosit dipacu $IFN\gamma$ dalam membunuh sel-sel mikroba dengan meningkatkan kerusakan intraseluler pada mikroba. Fungsi subjek Th1 efektor adalah sebagai pertahanan infeksi dimana proses fagositosis sangat diperlukan. Fungsi $IFN\gamma$ sebagai pengatur leukosit dalam pertumbuhan, maturasi, dan diferensiasi sel-sel imun, mengaktifasi makrofag, sel NK, dan sel B dalam memproduksi imunoglobulin.

Hasil analisis data produksi $IFN\gamma$ menunjukkan P1,P2,P3 memproduksi lebih tinggi dibandingkan kontrol tetapi. Perlakuan P3 dengan inokulasi dosis 15,81 mg daun sambiloto memproduksi lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan P2 10,75 mg, dan P1 9,25 mg. Tubuh mencit yang terinokulasi bakteri *Salmonella*

typhimurium akan mempengaruhi sel-sel sistem imun alamiah yang lain. Bakteri *Salmonella typhimurium* yang masuk ke dalam tubuh mencit akan terjadi adanya kemotaksis, yaitu gerakan sel fagosit ke tempat terjadinya inokulasi mikroba sebagai respon. Kandungan flavonoid dapat meningkatkan sekresi IFN γ pada kultur sel makrofag dan sel timosit (Jain et al., 2008; Oka, 2000).

Hasil analisis data statistik antara kelompok dosis P1, P2, dan P3 pada mencit yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhimurium* dengan pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dengan dosis berbeda menunjukkan bahwa pemberian dosis ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) pada P3 memberikan efek yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok P2 dan P1 walaupun perbedaan tersebut tidak signifikan. Perlakuan ketiga P3 mungkin disebabkan oleh karena saat pemeriksaan sebagian jumlah sel limfosit pada kelompok dosis P2 dan P1 telah lebih cepat bermigrasi ke dalam jaringan limfoid untuk berdiferensiasi membentuk subset sel T dan sel B. *Andrographolide* merupakan salah satu komponen aktif yang terkandung dalam ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang berkhasiat dalam meningkatkan produksi IL-2 (Interleukin-2) yang bertanggung jawab untuk mengaktifkan diferensiasi limfosit (Dalimartha, 1999). Terdapat dua macam sel limfosit, yaitu sel T dan sel B. sel Th yang terpajan dengan antigen akan berdiferensiasi dan disebut dengan Th0, yaitu sel T CD $_4^+$ dan sel T CD $_8^+$. Sel T CD $_4^+$ berdiferensiasi menjadi sel Th1/Tdth yang berperan untuk mengerahkan makrofag dan sel inflamasi lainnya ke tempat terjadinya reaksi hipersensitivitas tipe lambat. Sel T CD $_4^+$ juga akan berdiferensiasi menjadi Th2 atas pengaruh sitokin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13. Sel Th2 atas pengaruh sitokin IL-4, IL-5, dan IL-6 inilah yang akan merangsang

sel B untuk menghasilkan imunoglobulin (Ig). Dalam kerjanya, sel B akan menjadi sel memori dan sel plasma, kemudian dari sel plasma inilah sel B yang pertama kali akan memproduksi IgM, dan perkembangan selanjutnya akan dibentuk imunoglobulin yang lain yaitu IgD, IgE, IgG, dan IgA. Berbeda dengan sel T CD_4^+ , sel T CD_8^+ mengenal antigen melalui jalur MHC-1. Sel T CD_8^+ yang keluar dari timus akan berdiferensiasi menjadi CTL/Tc yang fungsi utamanya adalah untuk menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri intraselular seperti *Salmonella typhimurium*. Sel Ts juga merupakan subset dari sel T. Sel ini berfungsi untuk mengontrol reaksi imun dan menekan aktivitas dari sel T dan sel B. Sel Ts ini akan menghentikan respon imun setelah sukses menginaktifkan dan menghancurkan antigen (Baratawidjaja, 2006).

Dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang diberikan pada mencit yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhimurium* akan menyebabkan semakin tinggi sekresi IFN γ . Perlakuan P1, P2, P3 adalah kelompok perlakuan yang diinfeksi bakteri *Salmonella thypimurium* menunjukkan hasil sekresi IFN γ yang lebih tinggi dibanding kontrol yang tidak diinfeksi. Peran IFN γ sebagai faktor aktivasi makrofag adalah meningkatkan kemampuan makrofag dalam membunuh virus dan mikroba intraseluler (Diemer et al., 1998). Berdasarkan hal tersebut di atas potensi imunostimulator ekstrak etanol Sambiloto terhadap produksi IFN γ pada mencit yang diinfeksi *Salmonella thypimurium*.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka kesimpulan dari penelitian ini antara lain:

1. Pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai imunostimulator dapat meningkatkan ekspresi interferon gamma mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.
2. Dosis yang paling efektif setelah pemberian ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang dapat meningkatkan ekspresi interferon gamma sebesar 9,22 mg/hari.

6.2 Saran

Saran yang dapat dikemukakan dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian ekstrak etanol sambiloto (*Andrographis paniculata*) pada kasus penularan infeksi *Salmonella typhimurium* berkhasiat dalam meningkatkan sistem imun, tetapi perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut terhadap jumlah makrofag.
2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap pemeriksaan batas keamanan untuk penggunaan sebagai imunostimulator.

RINGKASAN

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan salah satu tanaman obat di Indonesia yang dapat digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan obat herbal karena beberapa zat aktif yang terkandung di dalamnya yang dipercaya mempunyai khasiat untuk tubuh ketika mengalami penurunan fungsi. Salah satu zat aktif yang terkandung di dalam daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah zat *androgapholide* yang dapat digunakan sebagai imunostimulator ketika tubuh terserang sakit dengan cara mengaktifkan pertumbuhan dan pembelahan sel limfosit serta produksi IL-2 (Interleukin-2) yang bertanggung jawab untuk mempercepat diferensiasi sel limfosit (Dalimartha, 1999).

Upaya menanggulangi masalah kesehatan dan pengobatan terhadap suatu penyakit menjadi sangat penting, terutama bagi hewan ternak. Salmonellosis merupakan salah satu penyakit zoonosis yang disebabkan oleh bakteri intraseluler *Salmonella typhimurium* yang rentan menyerang hewan ternak.

Pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) pada penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan ekspresi interferon gamma pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba menggunakan 25 ekor mencit (*Mus musculus*) yang dikelompokkan secara random menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit dan diadaptasi selama tujuh hari. Kelompok K(-) hanya diberikan 0,5 ml CMC Na 0,5%. Kelompok P0 diinokulasi *Salmonella typhimurium* dan hanya diberikan 0,5 ml CMC Na 0,5%. Kelompok P0 diinfeksi *Salmonella typhimurium* tanpa diberikan terapi ekstrak sambiloto,

kemudian P1, P2, dan P3 diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dengan dosis berbeda yaitu P1 dengan dosis 4,42 mg/25 g BB/hari, P2 dengan dosis 6,82 mg/25 g BB/hari, P3 dengan dosis 9,22 mg/25 g BB/hari. Pemeriksaan dilakukan dengan dilakukan pembedahan untuk diambil organ limpa mencit yang kemudian dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan metode imunohistokimia.

Data dari hasil pemeriksaan yang diperoleh dianalisis statistik dengan analisis post hoc dengan uji kruskal wallis (lampiran 2) didapatkan hasil bahwa peningkatan rata-rata kelompok P (3) lebih tinggi daripada peningkatan rata-rata kelompok P (2) maupun P (1) analisis ekspresi IFN- γ menggunakan uji Kruskal Wallis diperoleh hasil ekspresi IFN- γ yang signifikan ($p < 0,05$) yg berarti perlakuan memberikan pengaruh yang bermakna terhadap nilai ujinya. Pemberian terapi sambiloto dapat meningkatkan ekspresi IFN- γ . Hal ini terbukti ekstrak sambiloto dapat meningkatkan ekspresi Interferon gamma pada semua dosis melalui pemeriksaan Imunohistokimia ditandai dengan hasil positif dengan adanya sitoplasma limfosit yang berwarna coklat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman. 2003. Cellular and Molecular Immunology Fifth Edition. Saunders Elsevier Science. Philadelphia.
- Agrawal, S. S. and V. K. Singh. 1999. Immunomodulators: A Review of Studies on Indian Medicinal Plants and Synthetic Peptides Part 1: Medicinal Plants. PINSAB65. No. 3 & 4, 179-204.
- Akbar, S. 2011. *Andrographis paniculata*: A Review of Pharmacological Activities and Clinical Effect. *Alternative Medicine Review*. 16 (1), 66-77.
- Apriyeni, I. 2004. Perbandingan Jumlah Sel Limfosit Dalam Darah Perifer Ayam Broiler Akibat Pemberian Antibiotik dan Probiotik. Skripsi Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Arrington, L. 1972. Introductory Laboratory Animal: The Breeding, Care, and Management of Experimental Animal Science. The Interstate Printers and Publishing, Inc. New York.
- Astuti, I. I. P. 2004. Pengaruh Jus *Aloe vera* Terhadap Proliferasi Limfosit, Produksi Reactive Oxygen Intermediate dan Koloni Kuman Organ Hepar Mencit *Balb/C* yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Tesis Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro. Semarang.
- Baratawidjaja, K. G. 2000. *Imunologi Dasar*, Ed-4. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Baratawidjaja, K. G. 2004. *Imunologi Dasar*, Ed-6. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Baratawidjaja, K. G. 2006. *Imunologi Dasar*, Ed-7. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Basuki, P. A. 2006. Infeksi Bakteri Intraseluler Pada Anak (Intracelullar Bacterial Infection in Children). Divisi Infeksi dan Pediatri Tropik Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Bijanti, R., M. G. A. Yuliani, R. S. Wahyuni, dan R. B. Utomo. 2010. *Buku Ajar Patologi Klinik Veteriner*, Ed-1. Airlangga University Press. Surabaya
- Bijanti, R., R. B. Utomo, R. S. Wahyuni, S. Budhy, dan M. G. A. Yuliani. 2014. *Penuntun Praktikum Patologi Klinik Veteriner*. Departemen Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Brooks, G. F., J. S. Butel, and S. A. Morse. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, Ed-1. Salemba Medika. Jakarta.

- Cox, J. 2000. Salmonella (Introduction). Encyclopedia of Food Microbiology, Volume III. Academic Press. San Diego.
- Dalimartha, S. 1999. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- D' Aoust, J. Y. 2000. *Salmonella* in The Microbiological Safety and Quality of Food. Volume II, 1233-1299. Aspen Publisher, Inc. Gaithersbug, Maryland.
- Dharmojoono. 2001. Limabelas Penyakit Menular dari Binatang ke Manusia. Milenia Populer. Jakarta.
- Ebadi, M. 2002. Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine. CRC Press. Washington DC.
- Elfahmi. 2007. Phytochemical and Bio-synthetic Studies of Lignans with a Focus on Indonesian Medicinal Plants. Disertasi pada Fasilitas Beddrif of Groningen The Netherlands.
- Eliza, D., Sumarmin, R., R. Sumarmin, dan G. Indriati. Pengaruh Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap Hematokrit Mencit (*Mus musculus L.*) Swiss Webster. Jurnal.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. Gramedia. Jakarta.
- Gamasinta, S. 2015. Pengaruh Infeksi *Salmonella typhimurium* Berbagai Pengenceran Secara Intraperitoneal Terhadap Jumlah Sel Makrofag Aktif Pada Mencit (*Mus musculus*). Skripsi Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Gramedia. Jakarta.
- Handayani, W. 2008. Asuhan Keperawatan pada Klien dengan Gangguan Sistem Hematologi. Salemba Medika: Jakarta
- Hoffbrand, V. 2006. At a Glance Hematology. Ekstrak Etanol Sambiloto: Jakarta.
- Ifandari, Suranto, Y. N. S. Wuryaningsih. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Meniran Merah (*Phyllanthus urinaria*) terhadap Penekanan Jumlah Limfosit pada Organ Timus Mencit Balb/C yang Diinfeksi Bakteri *Salmonella thypi*. Bioteknologi. 9 (1): 1-6, ISSN: 0216-6887.
- ITIS Taxonomy. Diupdate pada 9 Agustus 2010. *Andrographis paniculata*. <http://www.itis.gov/> diakses pada 7 Agustus 2014.
- Jay, J. M. 2000. Modern Food Microbiology. 6th Edition. Aspen Publisher, Inc. Maryland.
- Kasno, I., Bambang, Indranila, R. Budi, D. P. Ratna, dan I. W. Tri. 2000. Demam Tifoid, Belajar Bertolak Dari Masalah. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang.

- Kaufman, H. E. 2001. Immune Response to Intracellular Bacteria. Clinical Immunology Principles and Practice. Mosby. St Louis.
- Khasanah, N. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Respon Proliferasi Limfosit Limpa Mencit *Balb/C* yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Skripsi Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kresno, S. B. 2001. Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium, Ed-4. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Kumar.S, Gupta.P, Sharma.S, Kumar.D.2011. A Review on Imunostimulatory Plants. Journal of Chinese Integrative Medicine. 9(2), 117-128.
- Kusmardi, S. Kumala dan E. E. Triana. 2007. Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata L.*) Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. MakaraKesehatan. 11(2), 50-53.
- Kusriningrum, R. S. 2008. Perancangan Percobaan. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair. Surabaya.
- Lahuerta, A., T. Westrell, J. Takkinen, F. Boelaert, V. Rizzi, B. Helwigh, A. Ammon, and P. Makela. 2011. Zoonoses in the European Union: origin, distribution, and dynamics - the EFSA-ECDC summary report 2009. Article Euro Surveill, 16 (13).
- Lay, B. W. dan S. Hastowo. 1992. Mikrobiologi. Rajawali Press. Jakarta.
- Lestarini I. A. 2008. Pengaruh Pemberian *Phyllanthus niruri L* terhadap Respon Imunitas Seluler Mencit *Balb/c* yang Diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium*. [Tesis] Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P.V. Dunlap, and D. P. Clark. 2008. Biology of Microorganisms 12th Edition. Hal : 719-720.
- Mangkuwidjojo, S., 2003. *Pedoman workshop teknologi dasar antibody monoclonal*. Yogyakarta: Laboratorium Ilmu Hayati UGM.
- Meyer, D. J., E. H. Cole, and L. J. Rich. 1992. Veterinary Laboratory Medicine Interpretation and Diagnosis. W. B. Saunders Company. London.
- Mills, S. and K. Bone. 2000. Principles and Practice of Phytotherapy (Modern Herbal Medicine). Churchill Livingstone Edition.
- Moriwaki, K. 1994. Genetic in Wild Mice: Its Application to Biomedical Research. Karger. Tokyo.
- Muliani, H. 2011. Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus L.*) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*). Bioma, 73-79.
- Nurohainah. 2007. Media Mikrobiologi Dasar. UI Press. Jakarta.

- Oktora, L. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Volume III (1), 01-07.
- Pantas, F. M. 2009. Pengaruh Pemberian Seduhan Teh Hitam (*Camelia sinensis*) Dosis Bertingkat Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Skripsi Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Parslow, T. G. 1997. *Immune Responses*, 9th Edition, 63-72. Prentice Hall, Medical Immunology. New Jersey.
- Poeloengan, M., I. Komala dan S. M. Noor. 2005. Bahaya *Salmonella* Terhadap Kesehatan. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis, 216-224. Badan Penelitian Veteriner. Bogor.
- Pramono, E. 2002. The commercial use of traditional knowledge and medicinal plants in Indonesia. Paper Submitted for Multi Stakeholder Dialogue on Trade, Intellectual Property and Biological Resources in Asia, BRAC Centre for Development Management, Rajendrapur, Bangladesh, April 19-21, 2002. <http://www.ictsd.org/dlogue/2002-04-19/Pramono.pdf> diakses pada 10 Agustus 2014.
- Pribadi, E. R. 2009. Pasokan dan Permintaan Tanaman Obat Indonesia Serta Arah Penelitian dan Pengembangannya. *Perspektif*. 8(1), 52-64.
- Pujiasmanto, B., J. Moenandir, Syamsulbahri, dan Kuswanto. 2007. Kajian Agroekologi dan Morfologi Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Pada Berbagai Habitat. *Biodiversitas*. 8(4), 326-329.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly, and F. C. Leonard. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell. British.
- Rantam, FA. 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan pertama Airlangga University Press. Surabaya, hlm.23-136
- Ratnani, R.D, I. Hartati, dan L. Kurniasari. 2012. Potensi Produksi Andrographolide Dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) Melalui Proses Ekstraksi Hidrotropi. *Momentum*, 8(1), 6-10.
- Sarudji, S., S. Chusniati, E. R. S. Iman, dan H. E. Narumi. 2013. *Petunjuk Praktikum Penyakit Infeksius I Program S-1 Kedokteran Hewan*. Departemen Pendidikan Nasional Universitas Airlangga Fakultas Kedokteran Hewan. Surabaya.
- Suhrman, S. dan C. Winarti. 2007. Prospek dan Fungsi Tanaman Obat sebagai Imunomodulator. *Buletin Perkembangan Teknologi Tanaman Rempah dan Obat*. 19(2), 121-133.
- Sukandar, E. Y. 2006. Tren dan Paradigma Dunia Farmasi, Industri-Klinik-Teknologi Kesehatan. http://itb.ac.id/focus/focus_file/orasi-ilmiah-dies-45.pdf diakses pada 20 Oktober 2014.

- Sunanti. 2007. Aktifitas Antibakteri Ekstrak Tunggal Bawang Putih (*Allium sativum* Linn.) dan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) Terhadap *Salmonella typhimurium*. Skripsi Program Pendidikan Sarjana FMIPA Institute Pertanian Bogor.
- Susanti, R., A. Yuniastuti dan R. S. Iswari. 2012. Aktivitas Reactive Oxygen Species Makrofag Akibat Stimulasi Gel Lidah Buaya Pada Infeksi *Salmonella typhimurium*. Jurnal MIPA 35 (1), 6.
- Tizard, I.R. 2008. Veterinary Immunology: An Introduction, 8 th ed. Philadelphia (PA): Saunders.
- Tyasningsih, W., R. Ratnasari, E. Rosilawati, Suryanie, H. E. Narumi, S. Chusniati, dan D. Handijanto. Penyakit Infeksius I. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair. Surabaya.
- Vital. P.G, Rivera.W.L.2009. antimicrobial Activity and Cytotoxicity of *Andrographis paniculata* King and Robinson and *Uncaria Perrottetii* 9a.Rich. Journal of medicinal Plants Research. 3(7),pp.511-518.
- Wagner, H. and P. Wolff. 1977. New Natural Products And Plants Drugs With Pharmacologycal Biologycal or Therapeutical Activity. Springer- Verlag. Berlin. Heiderberg. New York.
- WHO Regional Office for the Western Pacific. 1993. Research Guidelines for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila.
- Winn, Jr. and C. Washington. 2006. Koneman’s Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, 251-259. Lippincott Williams & Wilkins. USA.
- Williams, A.E.2012.Immunology : Mucosal and Body Surface Defence. Wiley-Blackwell:Hoboken,New Jersey: USA.
- Xu, Y. 2009. Adaptive immune response-modifying and antimicrobial properties of *Andrographis paniculata* and Andrographolide. Disertasi pada Award of Doctorate of Philosophy Department of Biological and Physical Sciences The University of Southern Queensland.
- Yusron M., M. Januwati dan E. R. Pribadi. 2005. Budidaya Tanaman Sambiloto. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika.
- Zein, U. 2009. Perbandingan Efikasi Antimalaria Ekstrak Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* ness) Tunggal dan Kombinasi Masing-Masing Dengan Artesunat dan Klorokuin Pada Pasien Malaria Falsiparum Tanpa Komplikasi. Disertasi Universitas Sumatra Utara. Medan.

Lampiran 1. Konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan dan manusia

| Hewan dan BB rata-rata | Mencit 20 g | Tikus 200 g | Marmut 400 g | Kelinci 1,5 kg | Kucing 2 kg | Kera 4 kg | Anjing 12 kg | Manusia 70 kg |
|------------------------|-------------|-------------|--------------|----------------|-------------|-----------|--------------|---------------|
| Mencit 20 g | 1,0 | 7,0 | 12,29 | 27,8 | 28,7 | 64,1 | 124,2 | 387,9 |
| Tikus 200 g | 0,14 | 1,0 | 1,74 | 3,9 | 4,2 | 9,2 | 17,8 | 60,5 |
| Marmut 400g | 0,08 | 0,57 | 1,0 | 2,25 | 2,4 | 5,2 | 10,2 | 31,5 |
| Kelinci 1,5 kg | 0,04 | 0,25 | 0,44 | 1,0 | 1,06 | 2,4 | 4,5 | 14,2 |
| Kucing 2 kg | 0,03 | 0,23 | 0,41 | 0,92 | 1,0 | 2,2 | 4,1 | 13,0 |
| Kera 4 kg | 0,016 | 0,11 | 0,19 | 0,42 | 0,45 | 1,0 | 1,9 | 6,1 |
| Anjing 12 kg | 0,008 | 0,06 | 0,10 | 0,22 | 0,24 | 0,52 | 1,0 | 3,1 |
| Manusia 70 kg | 0,0026 | 0,018 | 0,031 | 0,07 | 0,76 | 0,16 | 0,32 | 1,0 |

Dosis penelitian yang dipakai adalah sebagai berikut :

Dosis 1 : $\frac{\log 3}{\log 5,46} \times 5,46 = \frac{0,48}{0,74} \times 5,46 = 3,54 \text{ mg/20 g BB/hari}$ dan Bacharach, 1964)

$$\frac{\log 5,46}{\log 5,46} = \frac{0,74}{0,74}$$

$$25 \text{ g} \times 3,54 \text{ mg/20 g BB per hari} = 4,42 \text{ mg/hari}$$

Dosis 2 : $\frac{\log 5,46}{\log 5,46} \times 5,46 = \frac{0,74}{0,74} \times 5,46 = 5,46 \text{ mg/20 g BB/hari}$

$$25 \text{ g} \times 5,46 \text{ mg/20 g BB per hari} = 6,82 \text{ mg/hari}$$

Dosis 3 : $\frac{\log 10}{\log 5,46} \times 5,46 = \frac{1}{0,74} \times 5,46 = 7,37 \text{ mg/20 g BB/hari}$

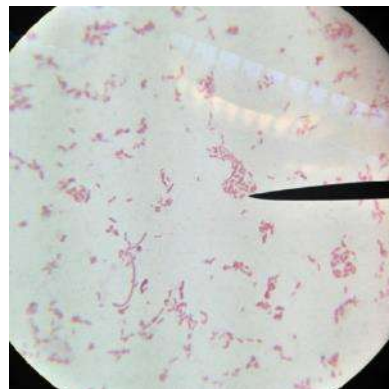
$$\frac{\log 5,46}{\log 5,46} = \frac{0,74}{0,74}$$

$$25 \text{ g} \times 7,37 \text{ mg/20 g BB per hari} = 9,22 \text{ mg/hari}$$

Lampiran 2. Identifikasi Bakteri *Salmonella typhimurium*

Bakteri *Salmonella typhimurium* yang didapatkan dari Laboratorium Pengujian Farmasi Universitas Airlangga Surabaya adalah dalam media *Nutrient Agar Slant* (NAS), kemudian dilakukan uji mikroskopis dengan pewarnaan Gram dengan beberapa langkah sebagai berikut:

1. Sediaan bakteri difiksasi di atas gelas preparat dan diwarnai dengan karbol kristal ungu selama 5 menit
2. Zat warna kristal ungu tersebut kemudian perlahan dibilas dengan air mengalir dan diangin-anginkan hingga mengering
3. Sediaan diwarnai dengan larutan lugol dan didiamkan selama 45 detik
4. Larutan lugol ditiriskan dan sediaan dicuci dengan alkohol 96% selama 30 detik dan digoyang-goyangkan sampai tidak ada zat warna yang mengalir lagi
5. Sediaan dicuci dengan air mengalir secara perlahan, diangin-anginkan agar kering, kemudian diwarnai dengan air fuksin selama 2 menit.
6. Sediaan dicuci, dikeringkan, dan diperiksa di bawah mikroskop menggunakan *emersi oil*.



Gambar 6. Uji mikroskopis bakteri *Salmonella typhimurium* pada pewarnaan Gram perbesaran 1000x

Tahap akhir dari identifikasi bakteri *Salmonella typhimurium* ini adalah dengan uji aglutinasi menggunakan cairan antisera. Cairan antisera ditetaskan secukupnya di atas objek glass, kemudian kultur bakteri di media NAS yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil satu koloni menggunakan ose dan campurkan dengan cairan antisera di atas objek glass tersebut. Hasil menunjukkan positif bakteri *Salmonella typhimurium* apabila terjadi aglutinasi (bentukan pasir) antara campuran bakteri *Salmonella typhimurium* dan cairan antisera

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian (Lain-Lain)



Gambar 1. DENSI *Check*
Farland *standart automatic*)



Gambar 2. Pengenceran bakteri (*Mc*
Salmonella typhimurium)



Gambar 3. Sentrifus (*centrifuge*)



Gambar 4. Inkubator



Gambar 6. Pembuatan suspensi
dengan CMC Na



Gambar 7. Hewan coba mencit (*Mus musculus*)



Gambar 8. Infeksi *Salmonella* (*Mus typhimurium* 10^5 sel/0,5 ml



Gambar 8. Daun sambiloto yang dikeringkan (*Andrographis paniculata*)



Gambar 9. Serbuk sambiloto

Lampiran 4. Analisis Data Dengan SPSS

Kruskal-Wallis Test

Ranks

| | kelompok | N | Mean Rank |
|----------------|-----------|----|-----------|
| ekspresi ifn.y | kontrol - | 5 | 4.50 |
| | kontrol + | 5 | 11.90 |
| | 9,25mg | 5 | 13.20 |
| | 10,75mg | 5 | 15.60 |
| | 15,81 | 5 | 19.80 |
| | Total | 25 | |

Test Statistics^{a,b}

| | ekspresi ifn.y |
|-------------|----------------|
| Chi-Square | 12.178 |
| Df | 4 |
| Asymp. Sig. | .016 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

Mann-Whitney Test

Ranks

| | kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|----------------|-----------|----|-----------|--------------|
| ekspresi ifn.y | kontrol + | 5 | 5.10 | 25.50 |
| | 9,25mg | 5 | 5.90 | 29.50 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^a

| | ekspresi ifn.y |
|--------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | 10.500 |
| Wilcoxon W | 25.500 |
| Z | -.423 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .672 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .690 ^b |

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

Lampiran 5. Hasil Skoring Preparat Histopatologi Organ Limpa Mencit

| Kode preparat | Rerata Immuno Reactive Score (IRS) /5LP | Keterangan |
|---------------|---|------------|
| k- | 2 | 3.2 |
| k- | 4 | |
| k- | 4 | |
| k- | 2 | |
| k- | 4 | |
| k+ | 6 | 5.6 |
| k+ | 6 | |
| k+ | 4 | |
| k+ | 8 | |
| k+ | 4 | |
| p1 | 6 | 7.6 |
| p1 | 8 | |
| p1 | 9 | |
| p1 | 12 | |
| p1 | 3 | |
| p2 | 4 | 8.6 |
| p2 | 6 | |
| p2 | 9 | |
| p2 | 12 | |
| p2 | 12 | |
| p3 | 9 | 10.8 |
| p3 | 12 | |
| p3 | 9 | |
| p3 | 12 | |
| p3 | 12 | |