



**EFEK HEPATOPROTEKTOR DAN IMUNOMODULATOR
BATANG BROTOWALI (*Tinospora cordifolia* Miers) PADA
INDUKSI DENGAN VAKSIN HEPATITIS B**

THESIS

Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan

Guna Mencapai Derajat Magister

Pada

Program Pascasarjana (S-2) Universitas Setia Budi

Diajukan oleh :

Nama: Rini Prastiwi

NIM : SBF 010710014

PROGRAM PASCA SARJANA (S-2)

UNIVERSITAS SETIA BUDI

2009

PENGESAHAN THESIS

Berjudul

EFEK HEPATOPROTEKTOR DAN IMUNOMODULATOR BATANG BROTOWALI (*Tinospora cordifolia* Miers) PADA INDUKSI DENGAN VAKSIN HEPATITIS B

Oleh :

Nama : Rini Prastiwi
NIM : SBF 010710014

Dipertahankan di Hadapan Dewan Penguji Thesis
Program Pasca Sarjana Ilmu Farmasi
Minat Penemuan Obat
Pada Tanggal : 17 Oktober 2009

Pembimbing Utama



Dr. Ediati Sasmito, SE., Apt.



Mengetahui
Program Pasca Sarjana
Direktur
U.b. Prof. Dr. Sasmito., Apt.

Pembimbing Pendamping



Dr. Rer. Nat. Yosi Bayu Murti, M.Si., Apt.

Dewan Penguji :

1. Dr. C.J. Soegihardjo, Apt.
2. Dr. Gunawan Pamudji, M.Si., Apt.
3. Dr. Rer. Nat. Yosi Bayu Murti, M.Si., Apt.
4. Dr. Ediati Sasmito, SE., Apt.
5. U.b. Prof. Dr. Sasmito., Apt.



HALAMAN PERSEMBAHAN

" Dan apabila hamba-KU bertanya kepadamu tentang Aku, maka sesungguhnya aku dekat. Aku kabulkan permohonan orang yang berdoa apabila dia berdoa kepada-Ku. Hendaklah mereka itu memenuhi perintah-Ku dan beriman kepada-Ku, agar mereka memperoleh kebenaran"
(Q.S : 2:186)

Kupersembahkan kepada :

*Allah azza wa jalla
Rasullulah SAW suri tauladanku
Bapak dan Ibu tercinta atas doa dan kasih sayangnya
Saudara-saudaraku mbak Ning dan mas Tono, mas Pras, adik Pranggono
Sahabat dan seseorang berarti bagiku, mas Ipung
Semua guru-guruku*

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa thesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Master di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengalaman saya 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.

Dan apabila thesis ini merupakan jiplakan dari penelitian, karya ilmiah atau thesis orang lain, maka saya siap menerima sanksi baik secara akademik maupun hukum.

Surakarta, Oktober 2009

Rini Prastiwi

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas semua rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan thesis ini. Thesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Magister Science (M.Si.) di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Thesis dengan judul “ **EFEK HEPATOPROTEKTOR DAN IMUNOMODULATOR BATANG BROTOWALI (*Tinospora cordifolia* Miers) PADA INDUKSI DENGAN VAKSIN HEPATITIS B**” Penulis menyadari bahwa selesainya penulisan thesis ini, tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak yang bersangkutan baik secara moril maupun material, maka pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Ediat Sasmito, SE., Apt., selaku Pembimbing Pertama yang telah banyak memberikan bimbingan serta arahan dalam pembuatan thesis ini.
2. Dr. Rer. Nat. Yosi Bayu Murti, M.Si., Apt., selaku Pembimbing Kedua yang telah banyak memberikan bimbingan serta arahan dalam pembuatan thesis ini.
3. Prof. Dr. Sasmito, Apt. (Almh), selaku Direktur Pasca Sarjana yang telah memberikan banyak dorongan semangat sehingga penulis bisa menyelesaikan thesis tepat waktu, semoga Allah SWT memberikan balasan yang baik bagi amal beliau, amin.
4. Ir. Surachmanto Hutomo, M.Sc. selaku Rektor Universitas Setia Budi, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis dalam pelaksanaan dari penulisan thesis.
5. Prof. Dr.R.A. Oetari, SU., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan ijin untuk pelaksanaan dan penyusunan thesis ini.

6. Dr. Sugihardjo, Apt., selaku Penguji Pertama yang telah meluangkan waktunya untuk menguji dan memberikan masukan dalam menyempurnakan thesis.
7. Dr. Gunawan Pamudji W., M.Si., Apt., selaku Penguji Kedua yang telah meluangkan waktunya untuk menguji dan memberikan masukan dalam menyempurnakan thesis.
8. Bapak, Ibu, dan saudara-saudaraku tercinta, sepupu-sepupuku, mas ipung, yang telah memberi semangat ,do'a, perhatian dan kasih sayangnya.
9. Teman – teman pasca sarjana angkatan 2007 terimakasih atas kerjasamanya, *Syukron, Jazakumullah khoiral jazza'*.
10. Sahabat-sahabatku serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah membantu hingga terselesaikannya thesis ini.

Surakarta, Oktober 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	4
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan dan Kegunaan Penelitian	4
BAB II TELAAH PUSTAKA	5
A. Telaah Pustaka	5
1. Sistem imunitas	5
1.1. Makrofag	6
2. Hepatitis	8
2.1. Alanin Aminotransaminase (ALT)	11
2.2. Mikroskopi Kerusakan Hati	11
3. Brotowali (<i>Tinospora cordifolia</i> Miers)	13
4. Kromatografi Kolom dan Kromatografi Lapis Tipis	14
B. Landasan Teori	15
C. Hipotesa	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	18
A Bahan dan Alat	18

1. Bahan	18
2. Alat	18
B. Jalannya Penelitian	18
1. Determinasi tanaman	18
2. Pengumpulan bahan	19
3. Penyiapan bahan	19
4. Penyediaan ekstrak batang brotowali (<i>Tinospora cordifolia</i> Miers)	19
5. Pemisahan sub fraksi aktif	20
5.1. KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	20
5.2. Kromatografi kolom vakum	20
6. Penyediaan dan persiapan hewan uji	21
7. Pemberian vaksinasi	23
8. Uji efek imunomodulator	23
8.1. Uji fungsi makrofag	23
8.2.1. Isolasi dan kultur sel makrofag	23
8.2.2. Uji sekresi ROI	24
9. Uji efek hepatoprotektor	24
9.1. Uji ALT (Alanin Aminotransferase)	24
9.2. Uji histologi hati	25
10. Analisis hasil	26
11. Identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi metanol	26
11.1 Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis	26
11.2. Penentuan kadar fenol total	26
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	28
A. Hasil Determinasi Tumbuhan	28
B. Pengeringan dan Pembuatan Serbuk	28
C. Pemisahan Senyawa	28
D. Uji Aktifitas	31
1. Uji efek imunomodulator	31
2. Uji Efek hepatoprotektor	36
2.1. Uji ALT	36

2.2.Uji Histologi Hati	39
3. Identifikasi sub fraksi aktif	43
4. Pembahasan	48
BAB V	54
KESIMPULAN DAN SARAN	54
A. Kesimpulan	54
B. Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Sel makrofag.....	7
Gambar 2. Tanaman brotowali dan batang brotowali.....	12
Gambar 3. Skema penyediaan dan persiapan hewan uji.....	22
Gambar 4 Skema Pemisahan senyawa dan uji aktifitas imunomodulator dan hepatoprotektor.....	29
Gambar 7. Sel makrofag dalam memfagositosis latek	35
Gambar 8. Sel makrofag dalam memfagositosis lateks tiap kelompok perlakuan	36
Gambar 9. Gambar sel normal dan piknotik.....	42
Gambar 10. Sel yang mengalami nekrosis pada tiap kelompok perlakuan.....	43
Gambar 11. Identifikasi senyawa alkaloid dengan fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak metanol : amoniak (100 : 1,5)	44
Gambar 12. Identifikasi senyawa steroid dengan fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak toluen : etil asetat (93 : 7)	44
Gambar 13. Identifikasi senyawa steroid dengan fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform : methanol (2 : 8)	45
Gambar 14 . Identifikasi senyawa flavonoid dengan fase diam sellulosa dan fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100 :11:11:27)	46
Gambar 15. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dalam fraksi methanol brotowali (<i>Tinospora cordifolia</i> Miers)	46
Gambar 16. Histogram rata-rata indeks fagositosis makrofag	51
Gambar 17. Histogram selisih rata-rata nilai ALT	52
Gambar 18. Histogram persentase rata-rata nekrosis	52
Gambar 19. Hasil <i>Hemagglutination test</i>	68

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Fase gerak untuk elusi gradien pada fraksi metanol	21
Tabel 2. Identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi metanol brotowali secara TLC.....	26
Tabel 3. Rata-rata indeks fagositosis tiap kelompok perlakuan	32
Tabel 4 . Rata-rata nilai ALT tiap kelompok perlakuan	38
Tabel 5. Rata-rata persentase nekrosis hati.	41
Tabel 6. Data kandungan senyawa tiap sub fraksi	47
Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa	48
Tabel 8. Hasil identifikasi uji aktifitas.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat keterangan pengambilan bahan dan determinasi tanaman	59
Lampiran 2. Surat keterangan pembelian mencit balb/c dari fakultas farmasi UGM	61
Lampiran 3. Berat tiap fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom vakum	62
Lampiran 4. Penentuan dosis	63
Lampiran 5. Data pengamatan uji makrofag	65
Lampiran 6. Data pengamatan aktivitas enzim ALT	66
Lampiran 7. Data pengamatan persentase nekrosis hati	68
Lampiran 8. Hasil tes <i>hemagglutination</i>	68
Lampiran 9. Hasil analisa uji makrofag dengan metode <i>Tukey HSD</i>	69
Lampiran 10. Hasil analisa uji ALT dengan metode <i>Dunett T3</i>	72
Lampiran 11. Hasil analisa uji histologi hati dengan metode <i>Dunett T3</i>	75
Lampiran 12. Kadar ALT Orientasi dengan metode <i>Tukey HSD</i>	78
Lampiran 13. Hasil data uji total fenol	81

INTISARI

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kemampuan brotowali terhadap pengaturan fungsi hepatoprotektif dan imunomodulator dengan penginduksi vaksin hepatitis B pada mencit balb c.

Pengujian aktifitas imunomodulator dengan menggunakan daya fagositosis sel makrofag, sedangkan pengujian hepatoprotektor dengan pemeriksaan serum ALT (Alanin Aminotransaminase) dan perubahan histopatologi sel hati. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Masing-masing terdiri dari 5 mencit. Kelompok T1 diberikan fraksi kloroform metanol dosis 0,3416 mg/20 gram BB mencit, T2 0,4844 mg/20 gram BB mencit, T3 0,0942 mg/20 gram BB mencit, T4 0,8671 mg/20 gram BB mencit), kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Induksi menggunakan vaksin hepatitis B (0,52 mcg / 20 g BB mencit) pada hari ke 7 dan 14. Percobaan dilakukan selama 28 hari.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengobatan dengan fraksi kloroform : metanol *Tinospora cordifolia* Miers memberikan pertolongan pada perbaikan fungsi hati dan fungsi imun pada penginduksian dengan vaksin hepatitis B. Fraksi yang aktif sebagai imunostimulan dan hepatoprotektor adalah fraksi T1 dengan dosis 0,3416 mg/20 gram BB mencit.

Kata kunci : Hepatoprotektor, imunostimulan, *Tinospora cordifolia* Miers

ABSTRACT

Effect of Tinospora cordifolia Miers on modulation of hepatoprotective and immunostimulatory functions in hepatitis B vaccine intoxicated mouse balb/c has been done. Administration of hepatitis B vaccine ,0526 mcg / mL suspensi/20 g Body weight mice balb/c) produces damage in the liver as evident by increase of enzymes such as alanin transaminase (ALT) and liver necrosis. Hepatitis B vaccine administration also causes immunosuppressive effects as indicated by phagocytic capacity of macrophage. Treatment with fraction chloroform : methanol of Tinospora cordifolia (fraction T1 dosage 0,3416 mg/20 gram Body weight balb/c, T2 0,4844 mg/20 gram bw balb/c, T3 0,0942 mg/20 gram bw balb/c, T4 0,8671 mg/20 gram bw balb/c) in hepatitis B vaccine intoxicated balb/c was found to protect the liver, as indicated by decrease of enzyme level in serum. A significant reduction in serum levels of ALT were observed during treatment with Tinospora cordifolia. Treatment with fraction chloroform : methanol of Tinospora cordifolia also increase the immunostimulant effect was observed by increment in the functional capacities of mouse peritoneal macrophages The results of our experiment show that treatment by fraction chloform : methanol of Tinospora cordifolia extract may be the critical remedy for the adverse effect of hepatitis B vaccine in liver function as well as immune functions. The active fraction as hepatoprotektor and imunostimulant function was T1 with dosage dosis 0,3416 mg/20 gram bw balb/c.

Key Words : Hepatoprotector, imunostimulant, Tinospora cordifolia Miers

BAB I
PENDAHULUAN
A. Latar Belakang

Hepatitis merupakan penyakit virus yang berbahaya dan perlu perhatian yang lebih. Pada organ hati yang terkena virus akan terjadi fibrosis, yaitu terbentuknya jaringan parut yang menggantikan sel-sel hati yang telah rusak. Pada awalnya, hati membentuk jaringan parut untuk melindungi dirinya dari peradangan, namun karena beratnya kerusakan, jaringan parut yang terbentuk pun semakin banyak sehingga hati tidak dapat berfungsi sebagaimana mestinya. Akibatnya, jaringan hati yang sehat tidak cukup untuk melakukan fungsi metabolisme, detoksifikasi dan fungsi lainnya untuk menjaga agar tubuh tetap sehat (Hargono, 1996).

Virus hepatitis B adalah virus nonsitopatik, yang berarti virus tersebut tidak menyebabkan kerusakan langsung pada sel hati, sebaliknya karena reaksi yang bersifat menyerang oleh sistem kekebalan tubuh yang biasanya menyebabkan radang dan kerusakan pada hati (Horn dan James, 2005). Selain itu virus hepatitis B dapat menyebabkan karsinoma hepatoseluler (Liang, 2002).

Obat-obat alam termasuk obat-obat nabati diakui masyarakat mempunyai peranan dalam upaya pemeliharaan. Pada akhir-akhir ini telah banyak berkembang peran *imunomodulator*, yaitu zat atau obat yang memperbaiki sistem imun dengan cara merangsang sistem imun pada orang yang sistem imunnya berkurang atau sebaliknya, menekan atau menormalkan sistem imun pada orang yang respons imunnya berlebihan.

Obat-obatan alam termasuk obat nabati dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan atau sistem imunitas tubuh, yang meliputi sistem imunitas spesifik maupun non spesifik, namun pengaruh tersebut lebih tertuju pada sistem imunitas tubuh yang tidak spesifik yaitu suatu sistem imunitas yang terdiri atas komplemen dan sel-sel fagositik. Pengaruh obat nabati tersebut dapat meningkatkan (stimulasi) dan dapat pula bersifat menurunkan (supresi) derajat imunitas yang bersangkutan. Obat yang dapat meningkatkan derajat imunitas disebut imunostimulator, sedang yang menurunkan derajat imunitas disebut immunosupresor.

Di pasaran telah tersedia berbagai macam obat antivirus. Ada yang bekerja menghambat replikasi virus, dengan menghambat pembentukan protein dan enzim yang dibutuhkan virus untuk perkembangbiakannya. Ada pula yang bekerja sebagai imunomodulator, yaitu selain aktif membasmi virus juga meningkatkan sistem kekebalan tubuh.

Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) merupakan salah satu tanaman yang dilaporkan mempunyai efek memperbaiki kerusakan hepatoseluler yang diinduksi oleh obat-obat TBC yaitu isoniazid, rifampicin dan pyrazinamid (Panchabai, 2008). Beberapa penelitian lain tentang brotowali dalam meningkatkan sistem imun diantaranya dilakukan oleh Adharyu *et al.* (2007) meneliti bahwa ekstrak air dari brotowali dapat meningkatkan respon imun dan mencegah kerusakan hepar pada induksi obat-obat TBC pirazinamid, rifampicin dan isoniazid. Penelitian Desai (2002) menyebutkan bahwa kandungan yang berkhasiat sebagai imunomodulator pada induksi dengan *shock endotoxic* adalah polysakarida, komponen aktif G1-4A yang diisolasi dengan metanol. Bishayi *et al.* (2002) meneliti bahwa ekstrak air brotowali dengan kadar 100 mg/kg BB

dapat menurunkan level serum SGOT (*Serum Glutamate Oxaloacetat transaminase*), SGPT (*Serume Glutamate Pyruvate Transaminase*), ALP (*Alkaline Phosphat*), bilirubin, dan juga menghilangkan efek immunosupresif pada pemberian CCL₄ yang ditandai adanya kemampuan peningkatan kapasitas fungsi makrofag. Brotowali dibuktikan juga mempunyai efek hepatoprotektor dengan mengevaluasi fungsi sel kupffer menggunakan tes *clearence carbon* sebagai parameter (Nagarkatti *et al.*, 1994). Sebagai anti tumor ternyata brotowali juga mempunyai kemampuan untuk menaikkan respon makrofag, interleukin 4 dan *tumor necrosis factor* (Singh Nisha *et al.*, 2005). Penelitian terbaru yang dilakukan oleh Kalikar *et al.* (2008) secara klinis menunjukkan bahwa brotowali sebagai imunostimulan dapat menurunkan insidensi terjadinya macam-macam *simptom* yang dihubungkan dengan penyakit pada 60% penderita HIV. Sedangkan dari segi tingkat keamanan telah dibuktikan secara klinik oleh Bairy dan Karkal (2007) bahwa brotowali aman dengan dosis 500 mg/hari pada pemberian selama 21 hari.

Berdasar uraian diatas menarik dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai apakah brotowali juga bisa sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor pada induksi vaksin hepatitis B, dan mengetahui senyawa yang aktif sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor. Metode penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya diantaranya Kisworo (2008) yang meneliti pengaruh pemberian ekstrak kloroform buah mengkudu terhadap titer IgG dan prolifersi limfosit pada mencit yang diinduksi vaksin hepatitis B serta penelitian lain yang dilakukan oleh Thalhah (2008) dan Metiani (2008).

B. Perumusan Masalah

Pada penelitian ini permasalahan yang akan diteliti adalah :

1. Apakah ekstrak brotowali mempunyai khasiat sebagai imunomodulator yang diinduksi oleh vaksin hepatitis B ?
2. Apakah brotowali mempunyai efek hepatoprotektor pada kerusakan hati yang disebabkan oleh induksi vaksin hepatitis B ?
3. Senyawa aktif apa yang berfungsi sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor dalam brotowali ?

C. Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui apakah ekstrak brotowali mempunyai khasiat sebagai imunomodulator yang diinduksi oleh vaksin hepatitis B.
2. Untuk mengetahui apakah brotowali mempunyai efek hepatoprotektor pada kerusakan hati yang disebabkan oleh induksi vaksin hepatitis B.
3. Untuk mengetahui senyawa aktif yang berfungsi sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor dalam brotowali.

BAB II

TELAAH PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Sistem imunitas

Sistem imunitas tubuh terdiri atas tiga bagian dimulai dari bagian luar sampai bagian dalam, yakni : Pertahanan terluar disebut pertahanan *Barrier* epitel (kulit dan selaput lendir), pertahanan baris kedua disebut mekanisme pertahanan (sistem imunitas) tak spesifik yang terdiri dari sistem komplemen, fagositosis. Pertahanan ketiga merupakan sistem reaksi-reaksi imunologik. Berdasarkan sistem imunitas yang diuraikan, maka jika ada mikroba yang mampu menembus ketiga sistem pertahanan tubuh tersebut, maka barulah mikroba penyerang berkembang dan tubuh penderita mulai merasakan akibatnya. Virus, bakteri, parasit dan fungi masing-masing dapat menggunakan strategi yang berbeda untuk dapat mengembangkan dirinya dalam hospes sebagai akibatnya respon imun untuk tiap kelas mikroba patogen juga berbeda (Hargono, 1996).

Manusia mempunyai dua mekanisme imun, yaitu imunitas bawaan (non spesifik) dan imunitas perolehan (spesifik). Imunitas bawaan terdiri dari pertahanan fisik, membran mukosa, fagositik dan sitotoksik dari netrofil, manosit, makrofag dan sel limfatik. Imunitas perolehan dapat diklasifikasikan ke dalam dua tipe yaitu, imunitas humoral dan imunitas seluler. Imunitas humoral diperantarai oleh immunoglobulin yang diproduksi oleh sel limfosit B dan bertanggung jawab untuk pengenalan dan eliminasi

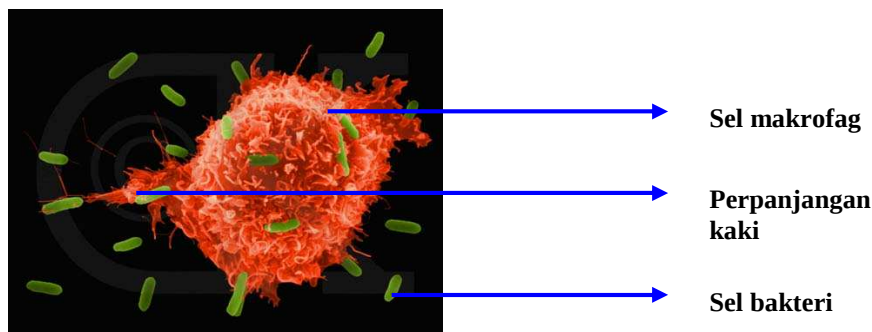
spesifik antigen ekstraseluler. Imunitas seluler diperantarai oleh sel-sel imun terutama sel limfosit T. Imunitas seluler bertanggung jawab untuk reaksi hipersensitivitas tipe lambat (Gibbs, 2000).

Salah satu upaya tubuh untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen, misalnya bakteri adalah menghancurkan bakteri bersangkutan dengan cara non spesifik dengan proses fagositosis. Supaya terjadi fagositosis, sel-sel fagosit harus berada pada jarak dekat dengan partikel atau bakteri atau partikel tersebut harus melekat pada permukaan fagosit. Hal ini dapat dicapai jika sel fagosit bergerak menuju sasaran, ini dimungkinkan berkat dilepaskannya zat atau mediator tertentu yang disebut leukotatik atau kemotaktik yang berasal dari bakteri maupun yang dilepaskan oleh neutrofil atau makrofag yang sebelumnya telah berada di lokasi bakteri, atau yang dilepaskan oleh komplemen (Kresno, 2001).

1. 1. Makrofag

Pada umumnya makrofag merupakan sel berbentuk tidak beraturan dengan cabang-cabang yang biasanya pendek, kadang mempunyai cabang yang langsing panjang. Sel ini tidak memiliki ciri morfologis yang membedakan dengan pasti dari sel lain. Mereka diidentifikasi berdasarkan afinitasnya yang sangat besar terhadap zat warna koloid non toksik dan untuk materi halus yang tidak aktif. Makrofag mempunyai reseptor yang mengikat antibodi dan makrofag bersenjata demikian sanggup mencari dan menghancurkan antigen yang khas terhadap antibodi itu. Selama proses infeksi limfosit – T yang terangsang menghasilkan sejumlah limfokin yang menarik makrofag ke tempat yang membutuhkannya dan terus mengaktifkannya. Makrofag berukuran 10 – 30 mm, bentuk tidak teratur, inti lonjong atau bentuk ginjal letak eksentrik, mengandung granula

azurofilik. Makrofag merupakan sel yang panjang umurnya dapat bertahan berbulan-bulan dalam jaringan. Bila cukup dirangsang sel-sel ini dapat bertumbuh besar, membentuk sel epiteloid atau beberapa melebur menjadi sel datia (sel raksasa) multi nukleus, jenis-jenis sel yang ditemukan dalam keadaan patologis. Makrofag kadang-kadang mempunyai bentuk yang sangat tidak teratur dengan kaki-kaki palsu yang terjulur keseluruh arah, membran plasma yang melipat-lipat dan bertonjolan kecil-kecil. Keadaan permukaan demikian itu membantu perluasan fagositosis dan gerakan sel. Makrofag merupakan agen penting untuk pertahanan, karena dapat bergerak dan berdaya fagositosis. Mereka dapat bertindak sebagai pembersih, menelan sel darah yang keluar dari pembuluh darah, sel mati, bakteri dan benda asing. Selama fagositosis, zat renik partikel kecil dimasukkan melalui invaginasi membran sel. Begitu partikel yang difagositosis terbungkus dalam membran sel yang melipat ke dalam, akan menjauh dari permukaan sel masuk ke sitoplasma. Materi organik yang ditelan dihancurkan oleh kerja enzim proteolitik intrasel yang berasal dari lisosom primer. Makrofag juga berperan pada reaksi imunologis tubuh. Makrofag menelan, memproses dan menyimpan antigen, menyampaikan informasi kepada sel-sel berdekatan yang secara imunologis kompeten (Leeson *et al.*, 1996). Berikut di bawah ini adalah gambar sel makrofag



Gambar 1 . Sel makrofag

2. Hepatitis

Hepatitis adalah istilah umum yang berarti radang hati, yang mempunyai beberapa penyebab, termasuk racun dan zat kimia seperti alkohol berlebihan, Penyakit yang menyebabkan sistem kekebalan tubuh menyerang jaringan sehat dalam tubuh, yang disebut sebagai penyakit autoimun dan Mikroorganisme, termasuk virus.

Virus hepatitis dapat menyebabkan karsinoma hepatoseluler, salah satu dari delapan kanker yang umum di dunia. Kanker hati adalah salah satu yang dapat menaikkan angka kesakitan dan kematian di dunia. Insiden terjadinya kematian karena kanker ini adalah 1:1 dan kebanyakan pasien tidak bisa bertahan lebih dari satu tahun setelah di diagnosa penyakit ini (Liang, 2002)

Ada lima virus yang diketahui mempengaruhi hati dan menyebabkan hepatitis: HAV, HBV, HCV, virus hepatitis delta (HDV, yang hanya menyebabkan masalah pada orang yang terinfeksi HBV), dan virus hepatitis E (HEV). Tidak ada virus hepatitis F. Virus hepatitis G (HGV) pada awal diperkirakan dapat menyebabkan kerusakan pada hati, tetapi ternyata diketahui sebagai virus yang tidak menyebabkan masalah kesehatan, dan virus ini sekarang diberi nama baru sebagai virus GB-C (GBV-C). Periode masa inkubasi virus hepatitis B, infeksi akut 45 sampai 160 hari dengan periode masa inkubasi sekitar 90 hari. Infeksi hepatitis B akut dapat simptomatik maupun asimtomatik. Fase akut diikuti dengan infeksi yang didahului dengan sirosis, gagal hati, karsinoma hepatoseluler dan kematian (Poland *et al.*, 2004).

HAV (Hepatitis A Virus), HBV (Hepatitis B Virus), dan HCV (Hepatitis C virus) menyerang sel hati atau *hepatosit*, yang menjadi tempat yang bersahabat bagi virus untuk berkembang biak. Sebagai reaksi terhadap infeksi, sistem kekebalan tubuh

memberikan perlawanan dan menyebabkan peradangan hati. Bila hepatitisnya akut (yang dapat terjadi dengan HAV dan HBV) atau menjadi kronis (terjadi dengan HBV dan HCV) maka dapat berkembang menjadi jaringan parut di hati, sebuah kondisi yang disebut fibrosis. Lambat laun, semakin banyak jaringan hati diganti dengan jaringan parut seperti bekas luka, sehingga dapat menghalangi aliran darah yang normal melalui hati dan sangat mempengaruhi bentuk dan kemampuannya untuk berfungsi semestinya, yang disebut sebagai sirosis. Bila hati rusak berat, mengakibatkan bendungan di limpa dan kerongkongan bagian bawah sebagai akibat tekanan di organ yang tinggi. Dampak dari kondisi ini yang disebut sebagai hipertensi portal, termasuk pendarahan saluran cerna atas dan cairan dalam perut (asites). Kerusakan pada hati juga dapat mengurangi pembuatan cairan empedu yang dibutuhkan untuk pencernaan yang baik dan mengurangi kemampuan hati untuk menyimpan dan menguraikan bahan nutrisi yang dibutuhkan untuk hidup (Horn dan James, 2005).

Dampak lain dari hati yang rusak termasuk ketidakmampuan untuk menyaring racun dari aliran darah, yang pada akhirnya dapat menyebabkan penurunan kesadaran dan bahkan koma. Kerusakan hepatoseluler preikterik ringan dapat dideteksi dari peningkatan transaminase plasma dan dari peningkatan eksresi urobilinogen di dalam urin. Bila penyakit ini telah jelas, terdapat ikterus moderat disertai peningkatan bilirubin dikongjugasi dan total plasma, serta bilirubin di dalam urin tanpa urobilinogen dan warna feses pucat. Transaminase plasma meningkat. Konsentrasi albumin plasma mungkin sedikit menurun, Selama pemulihan dari serangan akut, bilirubin hilang dari urin dan urobilinogen timbul kembali (Baron, 1981).

Hepatitis B disebabkan oleh virus DNA yang tersusun dari (1) inti bagian dalam yang disintesis di dalam nukleus hepatosit dan mengandung antigen inti HbcAg, HbeAg; (2) kapsul luar yang disintesis dalam sitoplasma sel hepatosit mengandung HbsAg. Secara menyeluruh partikel tersebut berukuran 42 nm dan disebut partikel Dane, berstruktur sferis atau tubular (Chandrasoma, 2006). Cara utama penularan HBV adalah melalui parenteral dan menembus membran mukosa, juga dapat ditularkan oleh produk darah seperti semen, saliva, air mata. Masa inkubasi rata-rata adalah sekitar 60-90 hari (Price, 2006). Terdapatnya beragam antigen dan antibodi hepatitis B penting untuk menentukan titik tolak diagnosis. HbsAg muncul pertama kali pada akhir masa inkubasi, dan diikuti oleh HbeAg. Adanya HbeAg berhubungan erat dengan adanya partikel Dane yang infeksius dalam darah dan merupakan indikasi penularan. Pada pasien yang sembuh, HbsAg dan HbeAg menghilang pada awal penyembuhan. Antibodi yang pertama timbul adalah anti Hbc pada masa akut, diikuti Hbe dan anti Hbs. Terdapatnya anti Hbe menandakan tidak menular. Perubahan morfologi yang terjadi pada hati sering kali mirip untuk berbagai virus yang berlainan. Pada kasus yang klasik, hati tampaknya berukuran dan berwarna normal, namun kadang agak edema, membesar dan nyeri tekan. Secara histologi, terjadi kekacauan susunan hepatoseluler, cedera dan nekrosis hati dalam beberapa derajat, dan peradangan periportal. Perubahan ini bersifat reversibel sempurna bila fase akut penyakit mereda. Pada beberapa kasus, nekrosis submasif atau masif dapat mengakibatkan gagal hati fulminan dan kematian (Price, 2006). Gejala prodromal timbul pada semua penderita, terutama 1 atau 2 minggu sebelum awal ikterus berupa *malaise*, rasa malas, anoreksia, sakit kepala, demam, *nausea*. Sesudah itu akan terjadi ikterus kemudian diikuti berbagai keluhan yang menonjol yaitu anoreksia, nyeri perut kanan

atas, pruritus, akan terjadi hepatomegali dengan hati yang melunak. Enzim hati yang berasal dari sel nekrotik memasuki peredaran darah yang tampak pada awal perjalanan penyakit (Soedarto, 1990). Kerusakan dan perbaikan kerusakan hati dapat ditentukan berdasarkan serum enzim seperti AST dan ALT, bilirubin, perubahan histopatologi dari hati, perubahan biokimia pada hati. Kenaikan penanda enzim dalam serum ini menunjukkan adanya kerusakan hati (Subramoniam, 1999).

2.1. Alanin aminotransaminase (ALT)

Analisa enzim alanin aminotransferase (ALT) atau dulu disebut Serum Glutamat-Piruvat Transaminase (GPT) meningkat pada destruksi jaringan seperti kerusakan hati. Enzim ALT banyak terdapat pada organ hati, karena itu enzim ini cukup spesifik dalam mendeteksi adanya kerusakan hati dalam stadium dini. Pada hepatitis virus transaminase meningkat di atas normal selama masa prodromal. Nilai puncak (sekitar 500-2000 U/l) ditemukan pada waktu penyakit maksimum dan nilai menjadi normal dalam sekitar empat minggu kecuali timbul penyakit hepar sub akut (Baron, 1981).

2.3. Mikroskopi kerusakan hati

Sel hati dikatakan normal apabila sel-selnya tersusun radier, inti normokromatis, bentuk sel sama (isositosis), tidak ada kelainan pada sitoplasmanya. Hati dikatakan tidak normal apabila inti piknotik yaitu bila inti sel itu menyusut, batas tidak teratur, berwarna gelap prosesnya dinamakan piknosis sedangkan intinya disebut inti piknotik, bentuk sel tidak sama (anisositosis) dan terdapat kelainan pada sitoplasmanya (Price dan Wilson, 2006).

3. Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers)

Brotowali adalah semak memanjat, tahunan. Batangnya bulat berkayu dengan permukaannya berbenjol-benjol, dan bercabang. Daunnya tunggal berbentuk jantung, panjang 7-12 cm dan lebar 7-11 cm ujung runcing tepi rata, pangkal berlekuk panjang, dengan bunga majemuk bentuk tandan. Khasiat brotowali yaitu batangnya dapat digunakan untuk *dyspepsia*, demam dan penyakit saluran kencing, anti inflamasi dan antipiretik (Thatte, 1992 ; Dahanukar, 1988 ; Jagetia, 1988). Brotowali banyak digunakan dalam pengobatan ayurveda sebagai komponen imunomodulator. Sekarang ini banyak sekali penelitian tentang brotowali di antaranya Ranjith (2008) telah meneliti bahwa ekstrak air dan etanol dari brotowali dapat menaikkan fagositosis secara *in vitro*, sedangkan ekstrak etanolnya dapat menginduksi kenaikan produksi antibodi secara *in vivo*. Gambar brotowali seperti terlihat dibawah ini :



Gambar 2. Tanaman brotowali dan batang brotowali

Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) mengandung *tinosporine*, *tinosporide*, *tinosporaside*, *cordifolide*, *cordifol*, *heptacosanol*, *clerodane furano diterpene*,

diterpenoid furanolactone tinosporidine, columbin dan *b-sitosterol*. Ekstrak air dari brotowali yaitu *arabinogalactan* menunjukkan aktifitas imunologi (Chintalwar *et al.*, 1999).

Ekstrak metanol mengandung *fenillpropanoid, norditerpene furan glycosides, diterpene furon glycosides* dan *plytoecdysones* (Gangan *et al.*, 1997). Pemberian dosis 10 mg/kg BB *epoxy clerodane diterpene* yang diisolasi dari brotowali berkhasiat kemopreventif potensial untuk melawan *diethylnitrosamine* yang menyebabkan *carcinoma hepatoseluler* (Dhanasekaran *et al.*, 2008).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Jagetia (2006) menunjukkan bahwa dosis ekstrak diklormetan brotowali 50 mg /kg BB dapat mencegah proliferasi sel-sel tumor. Panchabhai (2008) meneliti bahwa brotowali juga dapat berfungsi sebagai hepatoprotektor pada tikus yang di induksi dengan obat-obat TBC.

Klasifikasi tanaman brotowali adalah sebagai berikut :

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledonae*

Bangsa : *Ranunculales*

Suku : *Menispermaceae*

Marga : *Tinosporae*

Jenis : *Tinospora cordifolia* Miers (Depkes RI, 2001)

4. Kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis

Kromatografi Kolom (KK) merupakan teknik kromatografi yang sangat menguntungkan karena dapat digunakan untuk tujuan analisis maupun preparatif. KK tidak hanya digunakan untuk mengetahui banyaknya komponen dalam sampel tetapi juga dapat digunakan untuk melakukan pemisahan komponen-komponen dalam sampel untuk analisis lebih lanjut. Kerugian KK adalah memerlukan waktu yang lebih lama dan kita perlu memastikan pelarut atau campuran pelarut yang dapat menghasilkan pemisahan yang diinginkan (Gritter *et al.*, 1991)

Kromatografi kolom merupakan kromatografi cair padat menggunakan fase diam berupa zat padat, sedangkan fase geraknya berupa cairan. Teori kromatografi kolom hampir sama dengan teori Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Penjerap yang paling umum digunakan adalah silika gel dan alumina. Ukuran partikel penjerap pada KK biasanya lebih besar daripada ukuran partikel penjerap pada KLT. Pada KK ukuran partikel penjerap biasanya 60-250 μm . Sementara untuk KK yang dijalankan dengan memakai tekanan, baik dengan udara maupun pompa, ukuran antara 40-63 μm . Penjerap KLT mempunyai ukuran yang lebih kecil dari 63 μm (Gritter *et al.*, 1991).

KLT adalah metode pemisahan fisiko kimia. Fase diam pada KLT ditempatkan pada penyangga yang berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok (Stahl, 1985). Fase diam yang paling umum pada KLT adalah silika gel dan alumina. Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang sederhana ialah campuran pelarut organik yang dipakai untuk memisahkan molekul yang mempunyai satu atau dua gugus fungsi dengan

cara kromatografi cair preparatif pada lapisan silika gel atau alumina aktif (Gritter *et al.*, 1991)

Bercak hasil pemisahan pada KLT sering kali merupakan bercak yang tidak berwarna. Deteksinya dapat dilakukan secara kimia, fisika dan biologi. Cara kimia yang biasa digunakan yaitu dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan cara pencacah radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet.

Penggunaan umum KLT untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya reaksi, menentukan efektifitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, serta untuk memantau kromatografi kolom (Failey dan Haines, 2002).

B. Landasan Teori

Respon imun sangat tergantung sistem imun untuk mengenali antigen yang terdapat pada patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan sumber antigen yang bersangkutan. Proses pengenalan antigen dilakukan oleh unsur utama sistem imun yaitu limfosit yang kemudian diikuti dengan melibatkan berbagai jenis sel. Bila sistem imun terpapar zat asing maka ada dua jenis respon yang terjadi yaitu respon imun non spesifik dan respon imun spesifik. Respon imun non spesifik diantaranya pertahanan fisik dan kimiawi, sel-sel fagosit yaitu polimorfonuklear dan makrofag serta *Natural Killer* (NK). Sistem imun spesifik terdiri dari sistem respon imun seluler seperti pengaktifan sel T *helper*, dan respon imun humoral yang

dilaksanakan oleh sel B dan produknya yaitu antibodi. Pada akhir-akhir ini telah banyak berkembang mengenai peran imunomodulator, yaitu zat-zat atau obat-obat yang memperbaiki sistem imun dengan cara merangsang sistem imun pada orang yang sistem imunnya berkurang dan sebaliknya, menekan atau menormalkan sistem imun pada orang yang respons imunnya berlebihan. Obat-obat yang berkhasiat sebagai imunostimulan yang biasa digunakan umumnya berdasarkan salah satu atau beberapa mekanisme respon pertahanan tubuh tersebut.

Hepatitis menjadi perhatian khusus karena selain belum ada vaksin dan obat yang benar-benar efektif, virus hepatitis pandai mengecoh dan berkembang tanpa diketahui sampai mencapai tahap berbahaya. Misalnya, kadar ALT dan AST yang dimanfaatkan untuk pemeriksaan penyang, terkadang nampak dalam rentang nilai normal atau hanya sedikit meningkat, padahal hati penderita sudah digerogeti virus tersebut. Di pasaran, telah tersedia berbagai macam obat antivirus. Ada yang bekerja menghambat replikasi virus, dengan menghambat pembentukan protein dan enzim yang dibutuhkan virus untuk perkembangbiakannya. Ada pula yang bekerja sebagai imunomodulator, yaitu selain aktif membasmi virus juga meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Hingga saat ini belum ada satupun obat antivirus yang bisa memusnahkan total virus hepatitis. Interferon termasuk dalam pengobatan yang bekerja sebagai immunomodulator. Alternatif pengobatan hepatitis dengan menggunakan bahan alam yang dapat mengobati hepatitis perlu dikembangkan baik dengan mekanisme pertahanannya terhadap hati (hepatoprotektor) maupun kemampuannya dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh (imunostimulan).

Brotowali merupakan salah satu tanaman yang dilaporkan mempunyai efek memperbaiki kerusakan hepatoseluler dan sebagai imunomodulator selain banyak fungsi

yang lain yaitu sebagai antipiretik, analgetik, pengobatan ulkus lambung (Bairy, 2004). Panchabha (2008) melaporkan bahwa *Tinospora cordifolia* Miers bisa memperbaiki kerusakan hepar yang disebabkan karena induksi obat-obat tuberkulosis. Penelitian Desai (2002) menyebutkan bahwa kandungan yang berkhasiat sebagai imunomodulator adalah polysakarida, komponen aktif G1-4A yang diisolasi dengan metanol, pada induksi dengan *shock endotoxic*.

Brotowali menjadi menarik untuk diteliti tentang khasiatnya sebagai hepatoprotektor dan imunomodulator pada penginduksian dengan vaksin hepatitis B.

C. Hipotesa

Berdasarkan tinjauan pustaka kita dapat menarik hipotesa :

1. Ekstrak brotowali bersifat sebagai imunomodulator pada induksi oleh vaksin hepatitis B.
2. Brotowali mempunyai efek hepatoprotektor pada kerusakan hati yang disebabkan oleh induksi vaksin hepatitis B.
3. Senyawa aktif yang berfungsi sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor dalam brotowali adalah senyawa yang bersifat polar.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama : Batang brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) yang di ambil dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat tradisional (B2P2TO2T) Tawang Mangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Mencit balb/c.

Bahan kimia : Metanol, amoniak, etil asetat, asam formiat, asam asetat, kloroform, toluen, Liebermann Burchad, asam sulfat 10 %, Dragendorf, vanilin-asam sulfat, sellulosa, silika gel GF₂₅₄, reagen kit ALT, Vaksin Hepatitis B, reagen RPMI (*Roswell Park memorial Institute*), larutan NBT, Hematoxyllin-eosin.

2. Alat

Alat : Inkubator CO₂ , sentrifuge berpendingin (IEC Centra 7R), *sentrifuge eppendorf* (Sorfall MC 12 V, Dupont), *Laminar Air Flow*, *inverted microscope* (Olympus), mikropipet , timbangan, alat-alat gelas, hemositometer, Spektrofotometer.

B. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat tradisional (B2P2TO2T) menurut buku C.A Backer (1968).

2. Pengumpulan bahan

Batang brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) diperoleh dari daerah Karangpandan, Karanganyar, Jawa Tengah. Batang brotowali dipilih yang sudah tua dan dikumpulkan pada bulan Desember 2008.

3. Penyiapan bahan

Batangnya dibersihkan, diiris, dan dikeringkan dalam oven dengan vakum, untuk menghindari kerusakan kandungan senyawanya. Diperoleh simplisia kering dibuat serbuk dan siap digunakan untuk pembuatan sediaan ekstrak.

4. Penyediaan ekstrak batang brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers)

Sebanyak 300 g serbuk kering diekstraksi dengan alat Soxhlet dengan *n*-heksan. Hasil soxhlet disaring, filtrat dipisahkan. Ampasnya diangin-angin hingga kering dan tidak berbau *n*-heksan. Selanjutnya ampas yang sudah kering, disoxhlet dengan etil asetat. Hasil soxhlet disaring, filtrat dipisahkan. Ampasnya diangin-angin hingga kering dan tidak berbau etil asetat. Ampas diekstraksi dengan Soxhlet dengan metanol. Hasil soxhlet disaring, pelarut diuapkan, sampai didapat sediaan kental. Filtrat hasil ekstraksi untuk tiap pelarut diuapkan, sampai didapat sediaan yang kental. Semua penguapan dilakukan dengan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 40° C.

Masing–masing fraksi dilakukan uji orientasi daya imunomodulator dan hepatoprotektor dengan uji *hemagglutination test* dan Uji ALT. Pengujian yang dilakukan didapatkan hasil fraksi yang aktif sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor adalah fraksi metanol. Kandungan senyawa dalam fraksi metanol selanjutnya dipisahkan menjadi sub fraksi dengan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom vakum.

5. Pemisahan sub fraksi aktif

5. 1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fraksi metanol yang paling aktif dari hasil orientasi dilanjutkan dipisahkan senyawanya dengan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam silica gel GF₂₅₄ dan beberapa macam campuran fase gerak dengan kepolaran yang berbeda. Hasil KLT yang dilakukan didapatkan pemisahan yang paling baik adalah dengan fase gerak campuran kloroform : metanol. Pemisahan senyawa selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom vakum dengan perbandingan fase gerak kloroform : metanol yang berbeda.

5.2. Kromatografi kolom vakum

Fraksi metanol dipisahkan menjadi beberapa sub fraksi lagi dengan metode kromatografi kolom vakum dengan sistem fase gerak bertingkat. Penyarian dilakukan atas dasar perbedaan tingkat polaritas. Ketigabelas sub fraksi hasil pemisahan tersebut dianalisis menggunakan KLT dengan fase diam silica gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform : metanol (2:8), dengan analisa UV₂₅₄ dan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat. Kromatogram yang sama dikumpulkan menjadi satu kelompok sub fraksi.

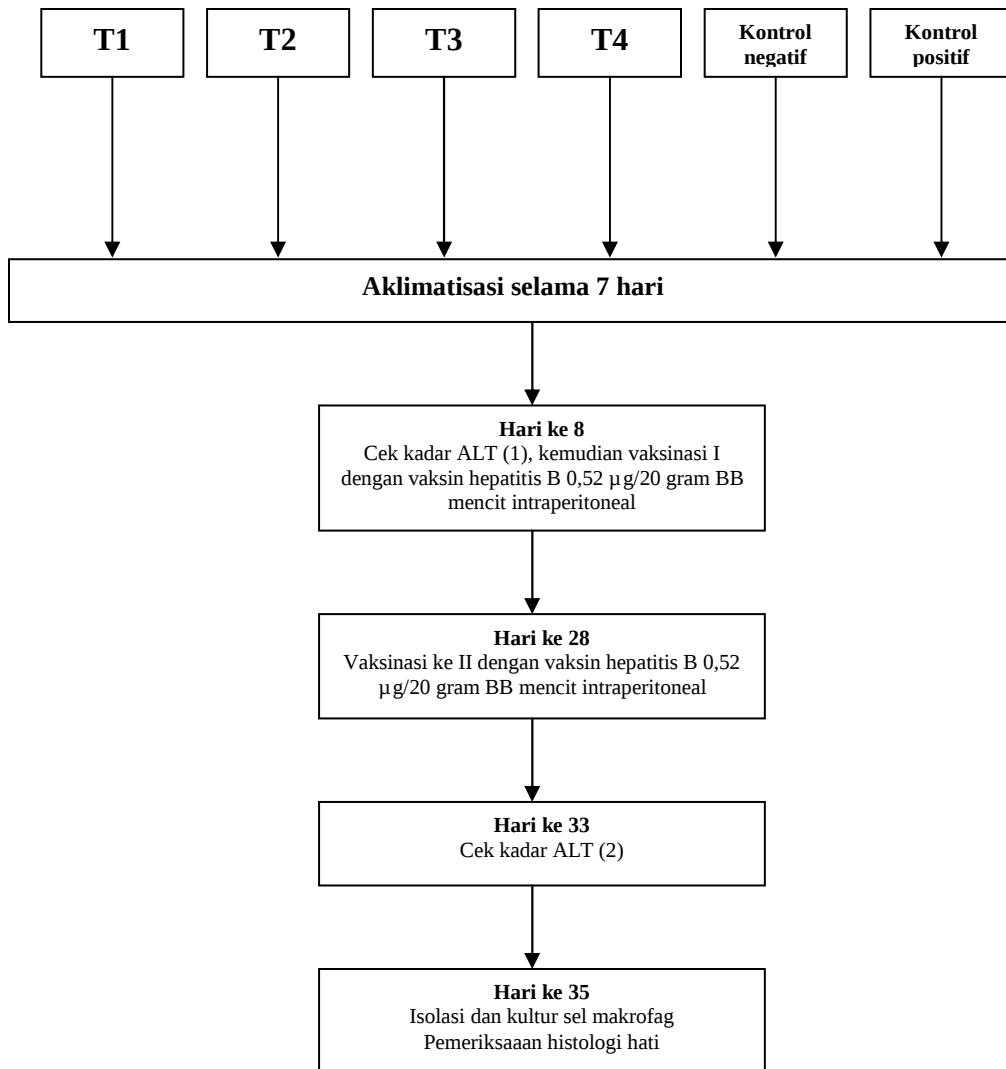
Tabel 1. Fase gerak untuk elusi gradien pada fraksi metanol

Fraksi	Pelarut	Perbandingan	Volume
1	kloroform	100	100
2	Kloroform : metanol	90 : 10	100
3	Kloroform : metanol	80 : 20	100
4	Kloroform : metanol	70 : 30	100
5	Kloroform : metanol	60 : 40	100
6	Kloroform : metanol	50 : 50	100
7	Kloroform : metanol	40 : 60	100
8	Kloroform : metanol	30 : 70	100
9	Kloroform : metanol	20 : 80	100
10	Kloroform : metanol	10 : 90	100
11	Metanol	100	100
12	Metanol : Air	50 : 50	100 (2x)

6. Penyediaan dan persiapan hewan uji

Digunakan hewan uji mencit galur Balb/c, jantan, umur 10 minggu, sehat, sebanyak 30 ekor, yang dibagi menjadi 5 grup perlakuan yang berbeda, (kontrol positif, kontrol negatif dan dosis masing-masing kelompok uji, kelompok T1 0,3416 mg/20 gram BB mencit, kelompok T2 0,4844 mg/20 gram BB mencit, kelompok T3 0,0942 mg/20 gram BB mencit, kelompok T4 0,8671 mg/20 gram BB mencit (Perhitungan dosis di lampiran), tiap grup terdiri dari 5 ekor mencit. Sebelum penelitian dilakukan, semua hewan uji ditimbang dan dipuasakan 1 malam. Selanjutnya hewan uji dipelihara selama 7 hari untuk penyesuaian diri terhadap lingkungan, menyeragamkan makanannya. Perhitungan dosis konversi manusia (70 kg) ke mencit (20 g) digunakan angka perkalian : 0,0026.

Kontrol positif yang digunakan sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor berbeda. Kontrol positif sebagai imunomodulator adalah Ekstrak *Echinacea* dari tablet Imboost® dengan dosis 0,65 mg/20 g BB mencit. Kontrol positif sebagai hepatoprotektor adalah ekstrak temulawak dari tablet Curcuma® dengan dosis 0,52 mg/20 gram BB mencit. Kontrol negatif adalah kelompok mencit yang diinduksi dengan vaksin hepatitis B dan hanya diberikan pakan biasa (tanpa zat aktif yang diberikan setiap hari). Untuk vaksin hepatitis B dosis 0,52 µg /20 g BB mencit . Berikut di bawah ini adalah skema penyediaan dan persiapan hewan uji.



Gambar 3. Skema penyediaan dan persiapan hewan uji

7. Pemberian vaksinasi

Setelah semua hewan uji disesuaikan dengan lingkungan selama 7 hari, diberi vaksinasi I (hari ke 8), vaksinasi II (hari ke 28) secara intraperitoneal.

8. Uji efek imunomodulator

Untuk penelitian ini, akan dilakukan :

8.1. Uji fungsi makrofag

Pengujian fungsi makrofag dilakukan melalui tahap-tahap sebagai berikut :

8.2.1. Isolasi dan kultur sel makrofag

Mencit dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%. Suntikkan 10 ml medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum, tunggu 3 menit sambil ditekan secara perlahan-lahan. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Cairan yang didapat ditampung dalam tabung sentrifuse pada 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 3 ml medium RPMI yang mengandung FBS 10% (*Fetal Bovine Serum* 10%) dan biasa disebut dengan RPMI komplet pada pellet yang didapat. Jumlah sel yang didapat dihitung dengan hemositometer, kemudian diresuspensikan lagi dengan medium RPMI komplet sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung dikultur pada sumuran mikroplat 24 yang telah diberi *cover slip* bulat, setiap sumuran 200 μ l. Diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 30 menit. Kemudian ditambahkan medium RPMI komplet 1 ml/sumuran dan diinkubasikan lagi selama 2 jam. Sel dicuci

dengan RPMI 2x ditambahkan medium komplet 1 ml/sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

8.2.2. Uji sekresi ROI

Kultur makrofag dicuci 2x dengan RPMI, kemudian ditambahkan 500 µl larutan NBT (1 mg/ml PBS) yang mengandung 125 mg/ml PMA dan diinkubasikan pada inkubator selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3x, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan 2% *neutral red solution* selama 15 menit kemudian dicuci dengan aquadest. Keringkan pada suhu ruangan dan sel makrofag yang menunjukkan reduksi NBT dapat diperiksa secara mikroskopis dengan perbesaran 400x.

Masing-masing kelompok perlakuan kemudian dihitung indeks fagositosisnya

(IF) dengan rumus :
$$\text{Index Fagositosis (IF)} = \frac{a \times b}{c}$$

Keterangan

a = Jumlah lateks yang difagosit oleh suatu makrofag

b = Jumlah makrofag yang memfagositosis lateks

c = Jumlah makrofag dalam sedimen

9. Uji efek hepatoprotektor

9.1. Uji ALT (Alanin Aminotransferase)

Darah tikus yang telah diambil lalu ditampung di dalam tabung, disentrifugasi agar sel-sel darah mengendap dan terpisah dari plasmanya (beningan di atas endapan). Darah dan reagen dicampur dan diamkan selama satu menit. Dihitung kadar enzim ALT pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 340 nm pada suhu 37° C.

Pengambilan darah dilakukan melalui vena mata dengan menggunakan pipa kapiler. Darah ditampung dalam tabung reaksi didiamkan selama 15 menit kemudian diputar dan

disentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Aktivitas enzim ALT yang dihitung, dinyatakan dalam U/L. Makin kuat daya anti hepatotoksik bahan uji, makin besar kemampuannya untuk mempertahankan aktivitas aminotransaminase.

9.2. Uji histologi hati

Pengamatan Hepatoseluler dilakukan dengan metode *Histologicall-microscopic photograph* menggunakan pengecatan *hematocylin-eosin* untuk melihat apakah terdapat perubahan pada sel hati, setelah pemberian perlakuan dengan masing-masing fraksi, dibanding dengan kontrol. Pengamatan preparat jaringan hepar dengan perbesaran 100 kali untuk mengamati seluruh lapangan pandang, kemudian ditentukan daerah yang akan diamati. Daerah yang akan diamati adalah daerah disekitar vena sentralis dan perifer lobulus hepar. Daerah perifer lobulus adalah daerah yang sel-selnya paling dekat dengan pembuluh darah sehingga akan mendapat pengaruh yang pertama kali dari zat-zat toksik yang akan didetoksifikasi di hepar. Pemilihan lobulus hati dilakukan secara acak dan masing-masing perparat diambil sebanyak 2 lobulus. Perbesaran mikroskop ditingkatkan menjadi perbesaran 1000 kali sehingga inti sel hati yang akan diamati tampak dengan jelas. Masing-masing lapang pandang kemudian dihitung jumlah total inti sel hati yang tampak lalu dihitung juga inti sel hati yang mengalami piknosis. Masing-masing preparat kemudian dihitung presentase kerusakan sel hati berdasarkan perbandingan antara jumlah inti piknotik dan jumlah total inti sel hati.

$$\text{Persentase nekrosis sel hati} = \frac{\text{Jumlah inti piknotik sel hati}}{\text{Jumlah total inti sel hati}} \times 100\%$$

10. Analisis hasil

Data kuantitatif yang diperoleh dari uji fungsi makrofag, uji ALT dan uji histologi hati dievaluasi secara statistik yang melibatkan semua kelompok perlakuan. Analisis statistik yang digunakan adalah analisis non-parametrik yaitu uji *one way ANOVA* dilanjutkan uji Tukey dan Dunett T3 dengan taraf kepercayaan 95 % .

11. Identifikasi kandungan senyawa kimia sub fraksi metanol

11.1 Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis

Sub fraksi metanol hasil pemisahan kromatografi kolom vakum ditetapkan kandungan senyawa kimianya. Fraksi dites kandungan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, glikosida. Berikut adalah tabel identifikasi kandungan senyawa kimia dalam fraksi brotowali secara TLC.

Tabel 2. Identifikasi kandungan senyawa kimia sub fraksi metanol brotowali secara TLC

Senyawa Kimia	Fase gerak	Fase diam	deteksi
Alkaloid	Metanol : amoniak (100 : 1,5)	Silika gel GF ₂₅₄	Dragendorf
Flavonoid	Etil asetat : Asam formiat : Asam asetat : Air (100 : 11 : 11 : 27)	Sellulosa	Amonia
Terpenoid	Kloroform : methanol (2 : 8)	Silika gel GF ₂₅₄	Liberman burchad
Steroid	Toluen : Etil asetat (93 : 7)	Silika gel GF ₂₅₄	Vanilin-asam sulfat
glikosida	Kloroform : methanol : air (3 : 1 : 0,1)	Silika gel GF ₂₅₄	Asam sulfat 10 %

Penentuan fase gerak berdasarkan Anonim (1978) dan Wagner, H. (1984)

11.2. Penentuan kadar fenol total

Total fenol ditentukan berdasarkan metode Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofor dan Lamuela-Ravento, 1999). Sampel sebanyak 50 μ L ditambah dengan 250 μ L reagen Folin-Ciocalteu. Sesudah 1 menit ditambah dengan 750 μ L larutan Na₂CO₃ dalam air 20% (b/w), kemudian ditambah dengan air sampai volume 5,0 μ L. Kontrol dilakukan

sama seperti dengan sampel. Inkubasi selama 2 jam kemudian ditentukan absorbansinya pada 760 nm dan dibandingkan dengan kurva kalibrasi asam gallat. Total fenol dihitung sebagai ekivalensi asam gallat (mg asam gallat/ gram ekstrak). Nilai ditetapkan sebagai rata-rata dari 3 kali replikasi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi Tumbuhan

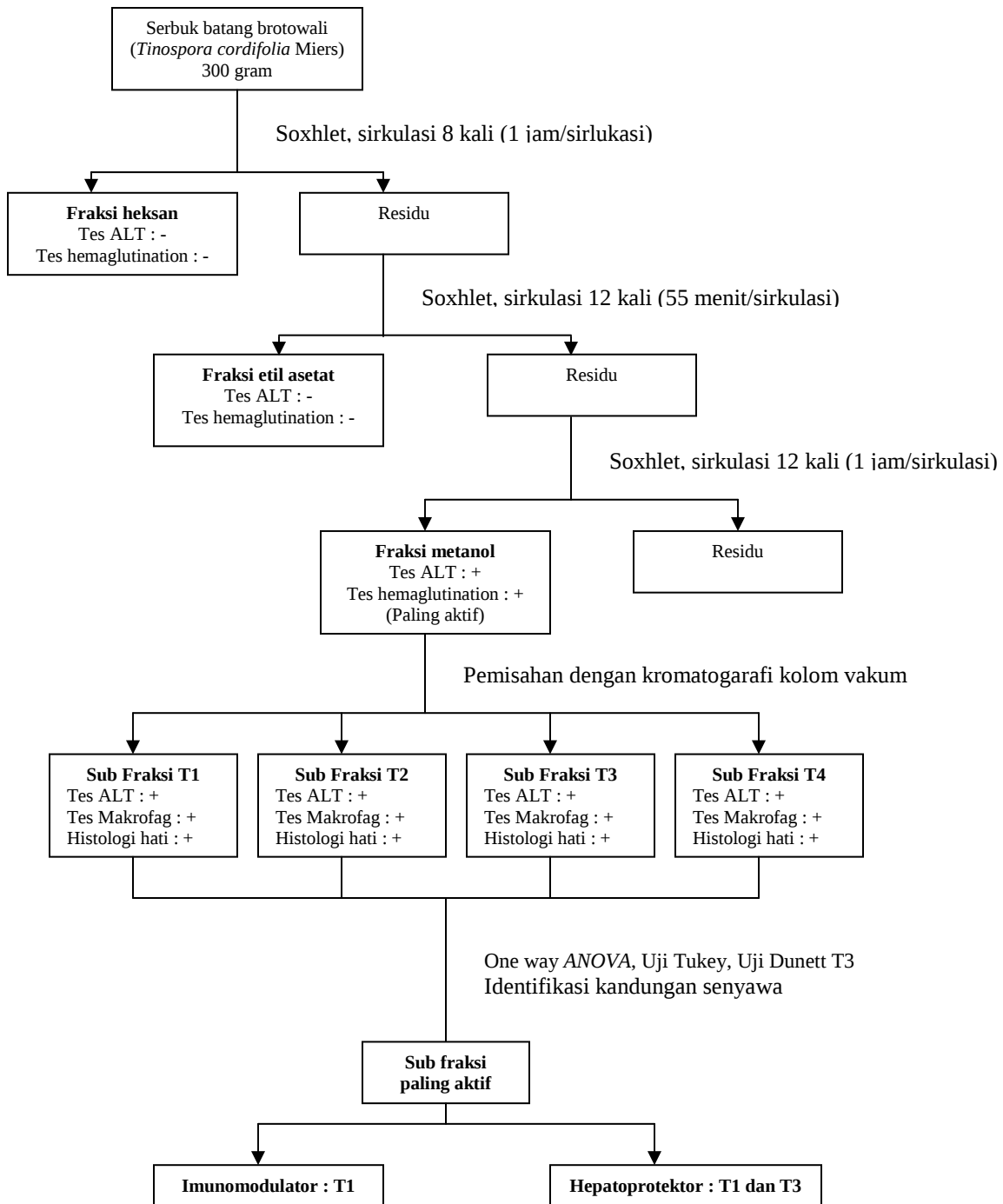
Hasil determinasi tumbuhan menyatakan bahwa tanaman yang telah diteliti adalah brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers), surat keterangan terlampir pada lampiran. Pelaksanaan determinasi tumbuhan dilakukan untuk mengetahui bahwa bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah benar-benar brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers), dan menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan utama yang akan diteliti.

B. Pengeringan dan Pembuatan Serbuk

Bahan utama yang dipakai, yaitu batang brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers). Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kandungan air dan mencegah pertumbuhan mikroba. Pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutupi kain warna hitam agar kerusakan senyawa aktif dapat dikurangi.

C. Pemisahan Fraksi

Berikut skema pemisahan senyawa dalam serbuk batang brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) dan uji aktifitas imunomodulator dan hepatoprotektor.



Gambar 4. Skema Pemisahan senyawa dan uji aktifitas imunomodulator dan hepatoprotektor

Keterangan gambar

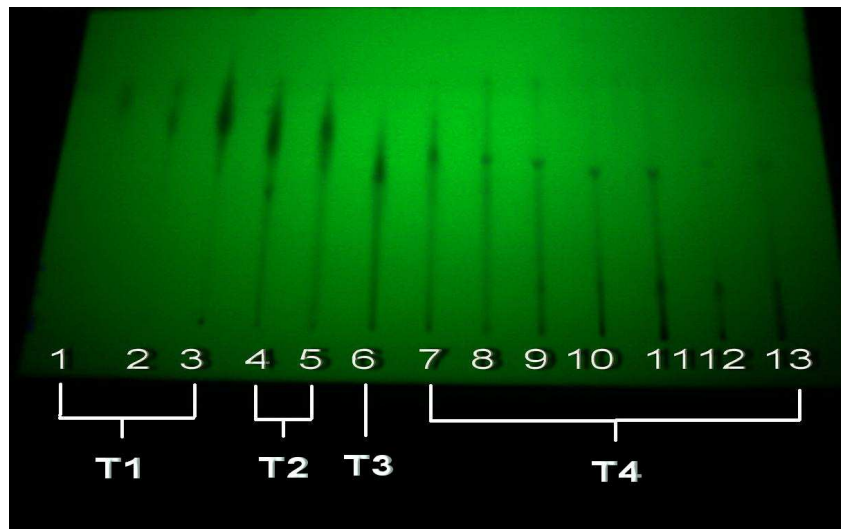
Tes ALT : + (memberikan penurunan kadar ALT)

Tes Makrofag : + memberikan peningkatan fagositosis makrofag

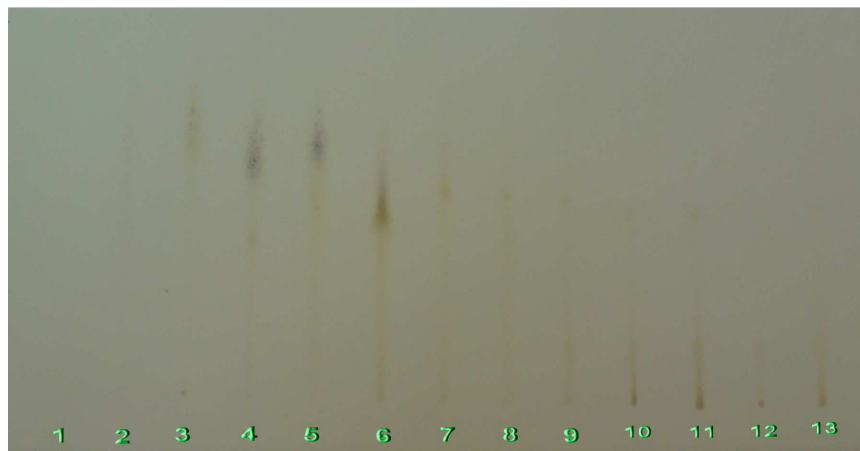
Tes Histologi : + memberikan penurunan persen piknotik

Simplisia kering batang brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) sebanyak 300 gram diekstraksi dengan Soxhlet menggunakan pelarut berturut dari non polar ke polar yaitu heksan, etil asetat dan metanol. Percobaan pendahuluan uji imunomodulator dengan *hemagglutination test* dan hepatoprotektor dengan uji ALT didapatkan hasil ekstrak yang paling aktif adalah fraksi metanol. Pada percobaan pendahuluan uji aktifitas dengan menggunakan tes hemaglutinasi ekstrak heksan dan etil asetat memberikan hasil negatif (tidak memberikan efek imunomodulator). Pada uji aktifitas enzim ALT, selisih nilai aktifitas penurunan enzim ALT yang terbaik adalah fraksi metanol. Berdasarkan hasil ini fraksi yang efektif sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor adalah fraksi metanol.

Fraksi metanol dipisahkan senyawanya menjadi sub fraksi metanol. Tiga gram fraksi metanol dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum, menggunakan fase gerak campuran kloroform dan metanol dengan 12 macam variasi perbandingan. Berdasarkan hasil uji KLT dengan fase gerak kloroform : metanol (2:8) fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat, kromatogram yang sama dikumpulkan dan didapatkan hasil menjadi 4 sub fraksi. Berdasarkan kromatogram diperoleh sub fraksi 1-3 (kelompok T1, sebanyak 366 mg), sub fraksi 4-5 (Kelompok T2, sebanyak 519 mg), sub fraksi 6 (kelompok T6, sebanyak 101 mg), sub fraksi 7-13 (kelompok T4, sebanyak 929 mg). Hasil kromatogram dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5. Kromatogram ekstrak metanol dengan fase gerak kloroform : metanol (2 ; 8) dengan fase diam Silika Gel GF₂₅₄ deteksi menggunakan UV₂₅₄.



Gambar 6. Kromatogram ekstrak metanol dengan fase gerak kloroform : metanol (2 ; 8) dengan fase diam Silika Gel GF₂₅₄ deteksi menggunakan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat.

D. Uji Aktifitas

1. Uji efek imunomodulator

Perubahan aktifitas fungsi makrofag diperlukan untuk diketahui dan dipelajari kemampuannya dalam memfagositosis lateks. Lateks merupakan poliskarida yang dianggap benda asing yang sangat direspon baik oleh mencit dan manusia, sehingga

adanya lateks akan memacu aktifitas makrofag yaitu dengan memfagositosis lateks (Sheehan, 1997). Kemampuan fagositosis sel makrofag diukur dengan cara menghitung peningkatan jumlah partikel lateks intra-sel.

Jumlah makrofag yang memfagositosis lateks tiap kelompok perlakuan berbeda. Berdasarkan hasil percobaan perhitungan jumlah rata-rata indeks fagositosis didapatkan data sebagai berikut :

Tabel 3. Rata-rata indeks fagositosis tiap kelompok perlakuan

NO	Kelompok perlakuan	Rata-rata Indeks Fagositosis
1	Kelompok T1	328.66 ± 35, 82
2	Kelompok T2	260.43 ± 42, 35
3	Kelompok T3	221.19 ± 45, 39
4	Kelompok T4	291.04 ± 23, 64
5	Kelompok kontrol positif	296.53 ± 40, 97
6	Kelompok kontrol negatif	170.69 ± 29, 47

Data fagositosis makrofag pada 6 kelompok perlakuan diuji statistik menggunakan uji *ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan pada fagositosis makrofag tiap kelompok. Pertama kali dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui data yang dihasilkan terdistribusi normal atau tidak. Apabila data yang didapat merupakan data terdistribusi normal, maka dilakukan uji parametrik tetapi jika data terdistribusi tidak normal dilanjutkan ke uji non parametrik.

Uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap data fagositosis makrofag memberikan hasil data terdistribusi secara normal, ini ditunjukkan dengan signifikansi percobaan lebih besar

dari 0,05 ($0,728 > 0,05$). Kesimpulan yang diambil bahwa data terdistribusi normal, sehingga uji dapat dilanjutkan dengan menggunakan ANOVA.

Uji homogenitas ANOVA didapatkan hasil percobaan sebesar 0,849, nilai tersebut lebih besar bila dibandingkan dengan 0,05 ($0,849 > 0,05$). Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa variasi fagositosis lateks oleh sel makrofag pada satu kelompok percobaan tidak berbeda secara bermakna, maka uji ANOVA baru dapat dilakukan. Uji yang digunakan selanjutnya adalah uji Tukey untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) pada respon fagositosis lateks oleh sel makrofag antara masing-masing kelompok perlakuan (T1, T2, T3, T4) dengan kelompok kontrol positif dan kontrol negatif.

Uji Tukey yang didapatkan terlihat tanda * (bintang) disebelah angka *mean difference* yang terdapat pada lampiran, ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara pemberian kelompok fraksi Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) dengan respon fagositosis lateks oleh makrofag. Secara langsung dapat menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna antar kelompok yang dibandingkan pada respon fagositosis lateks oleh sel makrofag.

Pada kelompok kontrol negatif memberikan perbedaan signifikan dalam peningkatan fagositosis lateks oleh sel makrofag dibandingkan dengan kelompok lainnya yaitu kelompok T1, T2, T4 dan kelompok kontrol positif. Ini terlihat dengan adanya tanda * (bintang) pada uji Tukey. Sedangkan dengan kelompok T3 tidak berbeda secara signifikan dalam peningkatan fagositosis lateks oleh sel makrofag, hal ini terlihat dengan tidak adanya tanda bintang. Artinya pemberian fraksi brotowali pada kelompok T1, T2, T4 dan kontrol positif *Echinaceae* tidak berbeda secara bermakna dalam meningkatkan

fagositosis lateks oleh sel makrofag. Rata-rata peningkatan fagositosis sel makrofag pada tiap kelompok yaitu : kelompok T1= 328.66, T2= 260.43, T4= 291.04 dan kontrol positif 296.53. Kemampuan rata-rata kontrol negatif dalam memfagositosis lateks oleh sel makrofag sebesar 170.69 yang tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok T3 dengan rata-rata fagositosis sel makrofag 221.19.

Pada kelompok T1 memberikan perbedaan signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag dengan kelompok lainnya yaitu kelompok T3 dan kelompok kontrol negatif, ini terlihat dengan adanya tanda bintang pada uji Tukey. Kelompok T1 tidak berbeda secara signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag bila dibandingkan dengan kelompok T2, T4 dan kontrol positif.

Pada kelompok T2 memberikan perbedaan signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag dengan kelompok lainnya yaitu kelompok kontrol negatif, ini terlihat dengan adanya tanda bintang pada uji Tukey. Kelompok T1 tidak berbeda secara signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag bila dibandingkan dengan kelompok T1, T3, T4 dan kontrol positif.

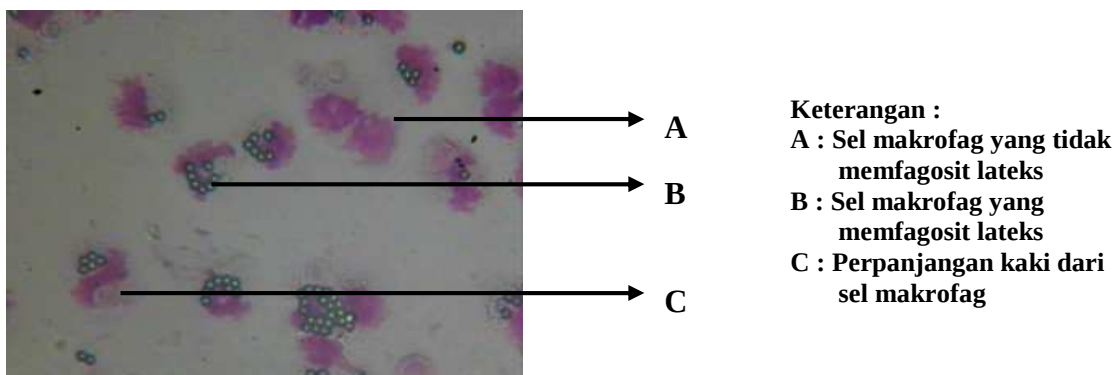
Pada kelompok T3 memberikan perbedaan signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag dengan kelompok lainnya yaitu kelompok T1 dan kelompok kontrol positif, ini terlihat dengan adanya tanda bintang pada uji Tukey. Kelompok T3 tidak berbeda secara signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag bila dibandingkan dengan kelompok T2, T4 dan kontrol negatif.

Pada kelompok T4 memberikan perbedaan signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag dengan kelompok lainnya yaitu kelompok kontrol negatif, ini terlihat dengan adanya tanda bintang pada uji Tukey. Kelompok T4 tidak berbeda secara

signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag bila dibandingkan dengan kelompok T1, T2, T3 dan kontrol positif.

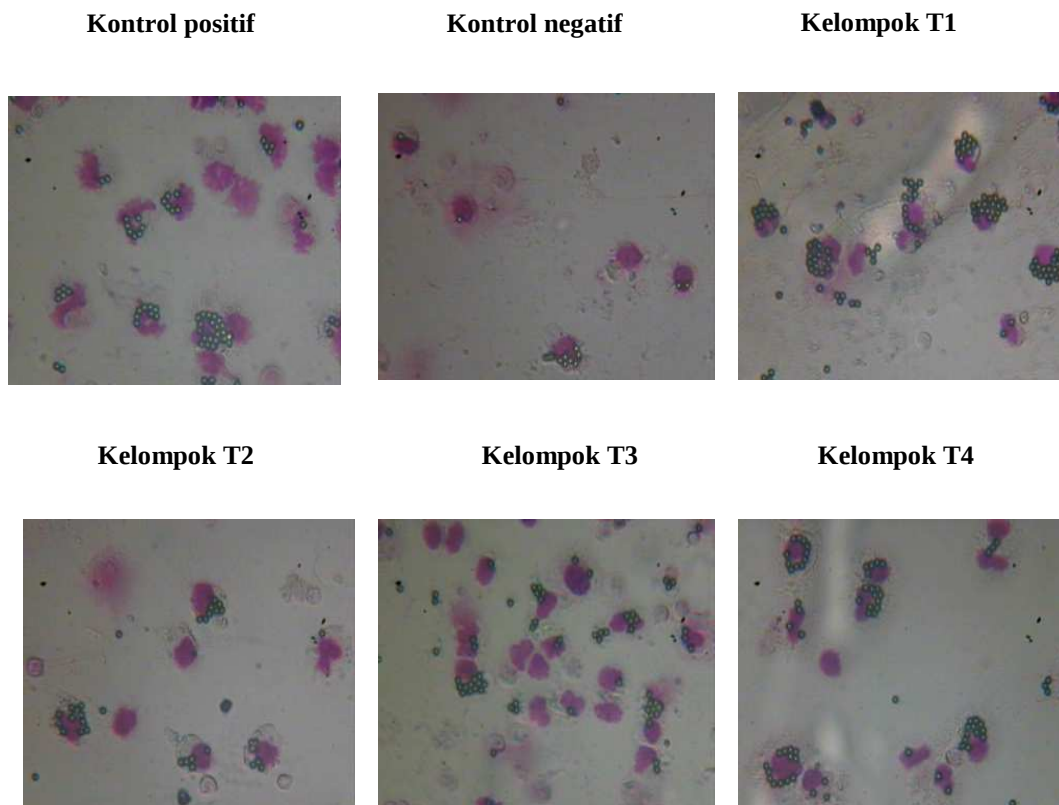
Pada kelompok kontrol positif memberikan perbedaan signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag dengan kelompok lainnya yaitu kelompok T3 dan kelompok kontrol negatif, ini terlihat dengan adanya tanda bintang pada uji Tukey,. Kelompok kontrol positif tidak berbeda secara signifikan dalam peningkatan fagositosis makrofag bila dibandingkan dengan kelompok T1, T2 dan T4.

Pada tes *homogenous* tukey didapatkan hasil tidak ada perbedaan yang signifikan rata-rata kemampuan fagositosis lateks oleh sel makrofag antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok T3 dengan signifikansi sebesar 0,29. Pada kelompok T3, T2, dan T4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata kemampuan fagositosis lateks oleh sel makrofag dengan signifikansi sebesar 0,06. Pada kelompok T1 dan kontrol positif tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kemampuan sel makrofag dalam memfagositosis lateks, dengan signifikansi sebesar 0,07. Berikut adalah gambar sel makrofag dalam memfagositosis lateks.



Gambar 7. Sel makrofag dalam memfagositosis lateks

gambar sel makrofag dalam memfagositosis lateks untuk tiap kelompok perlakuan terlihat seperti pada gambar di bawah ini.



Gambar 8. Sel makrofag dalam memfagositosis lateks tiap kelompok perlakuan

Berdasarkan nilai rata-rata kemampuan sel makrofag dalam memfagositosis lateks diperoleh nilai yang paling efektif adalah kelompok T1 yaitu sebesar 328,66.

2. Uji Efek hepatoprotektor

2.1. Uji ALT

Transaminase adalah sekelompok enzim yang merupakan katalisator dalam pemindahan gugus amino antara suatu asam alfa amino dengan asam keto (Soemohardjo *et al* 1983). Enzim transaminase dalam darah terdiri dari dua enzim yaitu ALT dan AST. *Alanine aminotransferase* (ALT) adalah enzim *aminotransferase* yang paling sensitif dan paling banyak digunakan di hati. Apabila terjadi kerusakan hati maka enzim yang berada pada sel-

sel hati akan tumpah ke dalam darah, sehingga akan meningkatkan kadar enzim ALT di dalam darah dan merupakan tanda terjadi kerusakan hati. ALT juga dikenal sebagai serum *glutamic pyruvic transaminase* (SGPT). ALT sebagian besar ditemukan di hati maka digunakan sebagai indikator yang spesifik dari kerusakan hati.

Data nilai ALT pada 6 kelompok perlakuan diuji statistik menggunakan uji ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan pada fagositosis makrofag tiap kelompok. Pertama kali dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui data yang dihasilkan terdistribusi normal atau tidak. Apabila data yang didapat merupakan data terdistribusi normal, maka dilakukan uji parametrik tetapi jika data terdistribusi tidak normal dilanjutkan ke uji non parametrik.

Uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap selisih kenaikan nilai ALT memberikan hasil data terdistribusi secara normal, ini ditunjukkan dengan signifikansi percobaan lebih besar dari 0,05 ($0,281 > 0,05$). Kesimpulan yang diambil bahwa data terdistribusi normal, sehingga uji dapat dilanjutkan dengan menggunakan ANOVA.

Uji homogenitas ANOVA didapatkan hasil percobaan sebesar 0,849, nilai tersebut lebih kecil bila dibandingkan dengan 0,05 ($0,047 < 0,05$). Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa variasi selisih nilai ALT pada satu kelompok perlakuan berbeda secara bermakna, maka uji ANOVA dilanjutkan dengan uji Dunett T3 untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) pada respon penurunan nilai ALT antara masing-masing kelompok perlakuan (T1, T2, T3, T4) dengan kelompok kontrol positif (*Curcuma*) dan kontrol negatif.

Uji Dunett T3 yang didapatkan terlihat tanda * (bintang) disebelah angka *mean difference* yang terdapat pada lampiran, ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara pemberian kelompok fraksi Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers)

dengan selisih kenaikan atau penurunan nilai ALT. Secara langsung dapat menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna antar kelompok pada kenaikan nilai ALT.

Pada kelompok kontrol negatif memberikan perbedaan signifikan dalam selisih penurunan nilai ALT dibandingkan dengan kelompok lainnya yaitu kelompok T1, T2, T3, T4 dan kelompok kontrol positif. Ini terlihat dengan adanya tanda * (bintang) pada uji Dunnett T3. Artinya pemberian fraksi brotowali pada kelompok T1, T2, T3, T4 dan kontrol positif *Curcuma* berbeda secara bermakna dalam menurunkan nilai ALT bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Rata-rata penurunan nilai ALT pada tiap kelompok yaitu : kelompok T1= 3.60, T2=5.20, T =11.80, dan kontrol positif= 1.60. Sedangkan pada kelompok T4 memberikan kenaikan nilai ALT sebesar 2.80. Kontrol negatif menaikkan nilai ALT rata-rata 21.26.

Tabel 4. Rata-rata nilai ALT tiap kelompok perlakuan

NO	Kelompok perlakuan	Rata-rata nilai ALT (U/L)
1	Kelompok T1	3.60 ± 0.89
2	Kelompok T2	5.20 ± 1.64
3	Kelompok T3	11.80 ± 8.64
4	Kelompok T	-2.80 ± 2.17
5	Kelompok kontrol positif	1.60 ± 4.62
6	Kelompok kontrol negatif	-21.26 ± 6.40

Pada kelompok T1 tidak memberikan perbedaan signifikan dalam penurunan nilai ALT yaitu pada kelompok T2, T3 dan kontrol positif. Sedangkan berbeda secara

signifikan dalam peningkatan nilai ALT bila dibandingkan dengan kelompok T4 dan kontrol negatif.

Pada kelompok T2 berbeda secara signifikan dalam peningkatan nilai ALT bila dibandingkan dengan kelompok T4 dan kontrol negatif, tetapi tidak memberikan perbedaan signifikan dalam penurunan nilai ALT yaitu pada kelompok T1, T3 dan kontrol positif.

Pada kelompok T3 berbeda secara signifikan dalam peningkatan nilai ALT bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, tetapi tidak memberikan perbedaan signifikan dalam penurunan nilai ALT yaitu pada kelompok T1, T2, T4 dan kontrol positif.

Pada kelompok T4 berbeda secara signifikan dalam penurunan maupun kenaikan nilai ALT bila dibandingkan dengan kelompok T1, T2 dan kontrol negatif, tetapi tidak memberikan perbedaan signifikan dalam penurunan nilai ALT yaitu pada kelompok T3 dan kontrol positif.

Pada kelompok kontrol positif berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, tetapi tidak memberikan perbedaan signifikan dalam penurunan nilai ALT yaitu pada kelompok T1, T2, T3 dan T4.

Berdasarkan nilai rata-rata kemampuan menurunkan nilai ALT diperoleh nilai yang paling baik adalah kelompok T1 yaitu sebesar 11.80

2.2.Uji Histologi Hati

Hati adalah organ utama dalam metabolisme obat, terutama obat-obat peroral. Enzim hati pada dasarnya merubah obat menjadi bahan yang lebih polar dan mudah larut dalam air sehingga mudah diekskresikan melalui ginjal. Parameter yang digunakan untuk

mengukur derajat kerusakan hati adalah jumlah inti piknotik yang merupakan pertanda terjadinya nekrosis sel. Bagian yang diamati intinya menyusut, batas tidak teratur dan berwarna gelap (Cotran dan Mitchell, 2004).

Data nekrosis hati pada 6 kelompok perlakuan diuji statistik menggunakan uji ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan derajat kerusakan hati yang signifikan pada tiap kelompok. Pertama kali dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui data yang dihasilkan terdistribusi normal atau tidak. Apabila data yang didapat merupakan data terdistribusi normal, maka dilakukan uji parametrik tetapi jika data terdistribusi tidak normal dilanjutkan ke uji non parametrik.

Uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap persentase kerusakan hati memberikan hasil data terdistribusi secara normal, ini ditunjukkan dengan signifikansi percobaan lebih besar dari 0,05 ($0,164 > 0,05$). Kesimpulan yang diambil bahwa data terdistribusi normal, sehingga uji dapat dilanjutkan dengan menggunakan ANOVA.

Uji homogenitas ANOVA didapatkan hasil percobaan sebesar 0,849, nilai tersebut lebih besar bila dibandingkan dengan 0,05 ($0,002 < 0,05$). Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa variasi terjadinya nekrosis pada hati dalam satu kelompok percobaan berbeda secara bermakna. uji yang digunakan selanjutnya adalah uji Dunett T3 untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) pada persentase penurunan nekrosis pada hati antara masing-masing kelompok perlakuan (T1, T2, T3, T4) dengan kelompok kontrol positif (*Curcuma*) dan kontrol negatif.

Uji Dunett T3 didapatkan tanda * (bintang) disebelah angka *mean difference* yang terdapat pada lampiran, ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara

pemberian fraksi Brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) dalam penurunan nekrosis hati antara masing-masing kelompok perlakuan.

Pada kelompok kontrol negatif memberikan perbedaan signifikan dalam penurunan nekrosis hati dibandingkan dengan dua kelompok lainnya yaitu kelompok T2, dan kelompok kontrol positif. Ini terlihat dengan adanya tanda * (bintang) pada uji Dunett T3. Sedangkan dengan kelompok T1, T3 dan T4 tidak berbeda secara signifikan dalam penurunan nekrosis hati dibandingkan dengan kontrol negatif, hal ini terlihat dengan tidak adanya tanda bintang.. Rata-rata penurunan nekrosis hati pada tiap kelompok yaitu : kelompok T1= 48.30%, T2= 41.06%, T3=46.95% T4= 48.28% dan kontrol positif 45.90%. Rata-rata terjadinya nekrosis pada kontrol negatif sebesar 65.52%.

Tabel 5. Rata-rata persentase nekrosis hati

NO	Kelompok perlakuan	Rata-rata nekrosis hati (%)
1	Kelompok T1	48.30 ± 2.45
2	Kelompok T2	41.06 ± 5.46
3	Kelompok T3	46.95 ± 3.25
4	Kelompok T4	48.28 ± 5.52
5	Kelompok kontrol positif	45.90 ± 3.34
6	Kelompok kontrol negatif	65.52 ± 8.62

Pada kelompok T1 tidak ada perbedaan signifikan dalam penurunan persentase nekrosis hati dengan kelompok lainnya yaitu kelompok T2, T3, T4, kontrol positif dan

kelompok kontrol negatif, ini terlihat dengan tidak adanya tanda bintang (*) pada uji Dunett T3,.

Pada kelompok T2 memberikan perbedaan signifikan dalam persentase nekrosis hati dengan kelompok kontrol negatif, ini terlihat dengan adanya tanda bintang pada uji Dunett T3. Kelompok T2 tidak berbeda secara signifikan dalam penurunan persentase nekrosis hati dibandingkan dengan kelompok T1, T3, T4 dan kontrol positif.

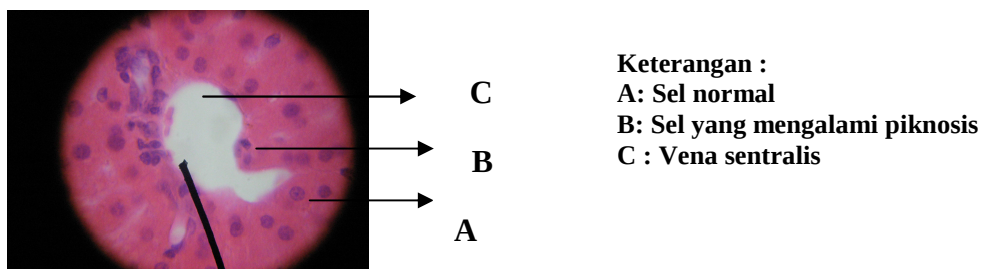
Pada kelompok T3 tidak ada perbedaan signifikan dalam persentase nekrosis hati dengan semua kelompok perlakuan, yaitu kelompok T1, T2, T4, kontrol negatif dan kontrol positif.

Pada kelompok T4 tidak ada perbedaan signifikan dalam persentase nekrosis hati dengan semua kelompok perlakuan, yaitu kelompok T1, T2, T3, kontrol negatif dan kontrol positif.

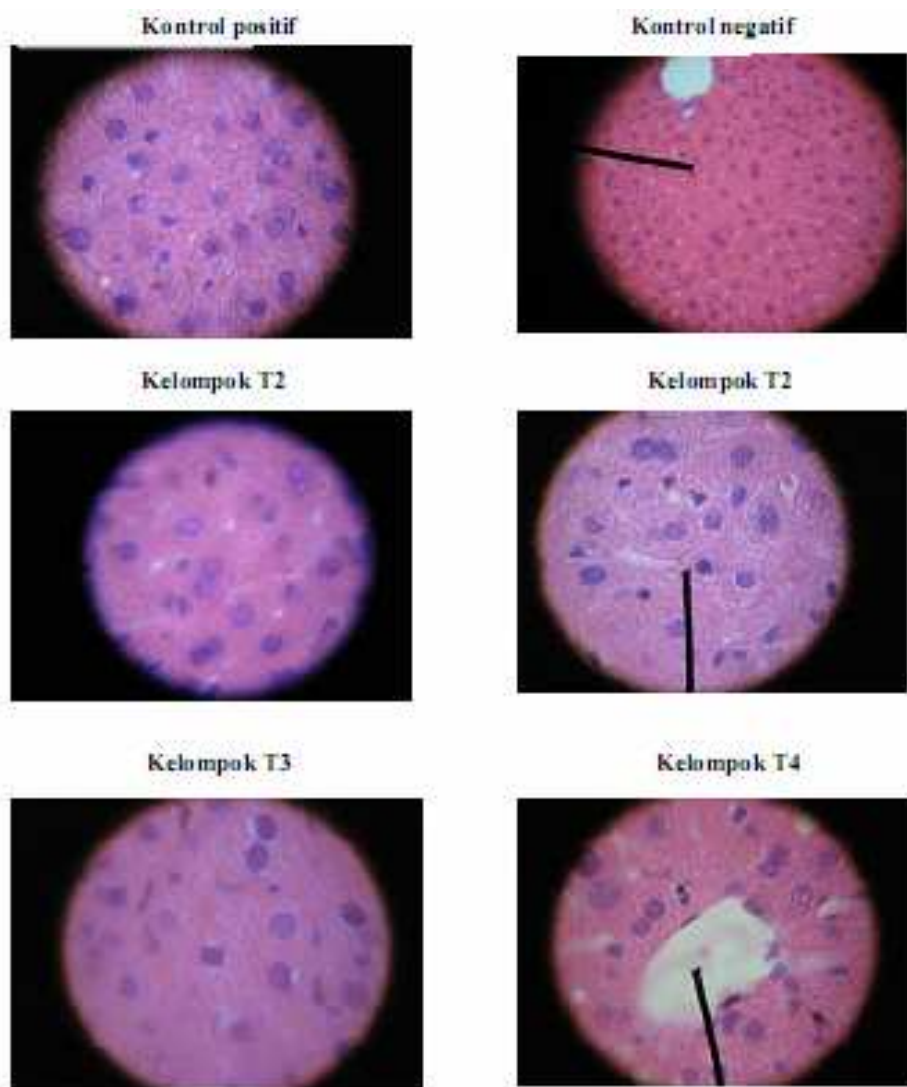
Pada kelompok kontrol positif terdapat perbedaan signifikan dalam persentase nekrosis hati dengan kelompok kontrol negatif, ini terlihat dengan adanya tanda bintang pada uji Dunett T3. Sedangkan dengan kelompok T1, T2, T3, T4 tidak berbeda secara signifikan dalam penurunan persentase nekrosis hati.

Berdasarkan nilai rata-rata kemampuan menurunkan persentase nilai nekrosis hati diperoleh nilai yang paling baik adalah kelompok T1 yaitu sebesar 48.30 %.

Pengamatan nekrosis dilihat inti sel yang terjadi piknosis :



Gambar 9. Sel normal dan piknotik.

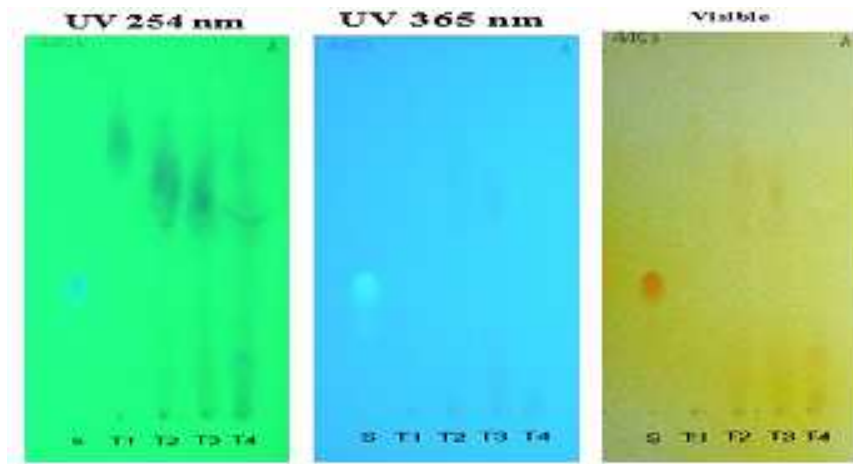


Gambar 10. Sel yang mengalami nekrosis pada tiap kelompok perlakuan.

3. Identifikasi sub fraksi aktif

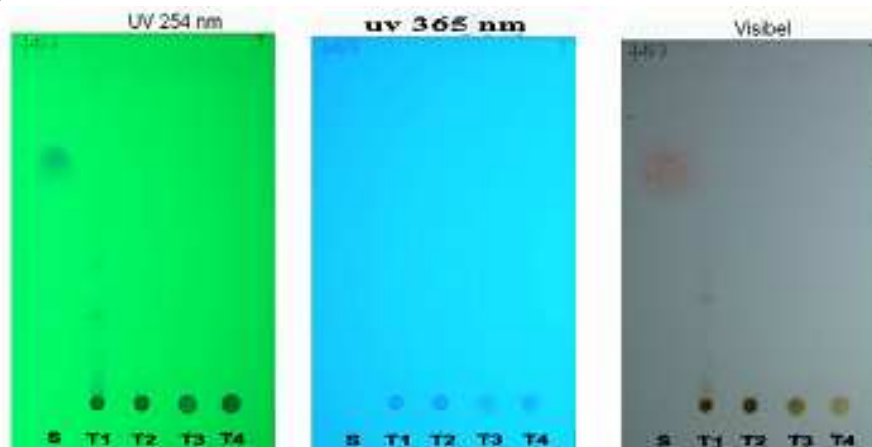
Kelompok fraksi T1, T2, T3, T4 dilakukan identifikasi kandungan senyawa aktifnya. Masing-masing senyawa aktif yang diuji adalah alkaloid, terpenoid, glikosida, flavonoid. Berikut adalah hasil identifikasi alkaloid dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄, fase gerak metanol : amoniak (100 : 1,5). Warna spot di bawah sinar UV₂₅₄ meredam dan UV₃₆₆ warna kuning dengan pereaksi Dragendorff memberikan warna spot alkaloid

orange. Alkaloid terdeteksi pada kelompok fraksi T1 Rf. – (negatif), fraksi T2 Rf. 0,69 (positif), fraksi T3 Rf. 0,63 (positif), fraksi T4 Rf. 0,15 (positif).



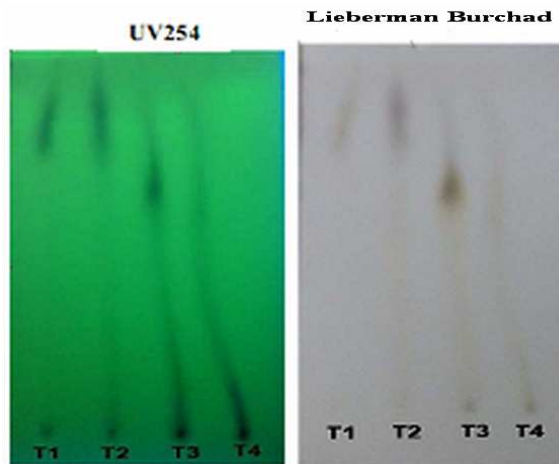
Gambar 11. Identifikasi senyawa alkaloid dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak metanol : amoniak (100 : 1,5) dan pereaksi Dragendorff

Pada identifikasi kualitatif steroid dengan TLC menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ fase gerak toluen : etil asetat (93 : 7) dan pereaksi vanillin-asam sulfat dan pembanding Tymol. Dipanaskan 100° C, kemudian diamati secara visibel. Didapatkan Warna spot di bawah sinar UV 254 nm meredam, sedangkan dengan pereaksi semprot didapatkan bercak warna merah violet. steroid terdeteksi pada kelompok fraksi T1 dengan harga Rf sebesar Rf. 0,31. Sedangkan pada kelompok T2, T3 dan T4 tidak terdapat bercak merah violet.



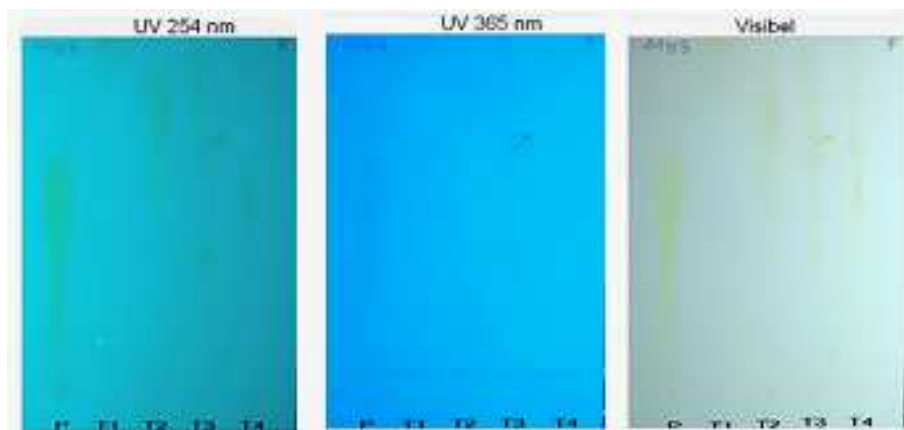
Gambar 12. Identifikasi senyawa steroid dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak toluen : etil asetat (93 : 7) dan pereaksi vanillin-asam sulfat

Pada identifikasi kualitatif terpenoid dengan TLC menggunakan fase diam Silika gel 60 F₂₅₄ fase gerak kloroform : metanol (2 : 8) dan pereaksi Lieberman-burchad didapatkan warna spot di bawah sinar UV 254 nm meredam, sedangkan dengan pereaksi semprot didapatkan bercak warna coklat abu-abu. Terpenoid terdeteksi pada kelompok fraksi T1 dengan harga Rf sebesar Rf. 0.83, kelompok T2 (Rf 0,83) dan kelompok T3 (Rf 0,67).



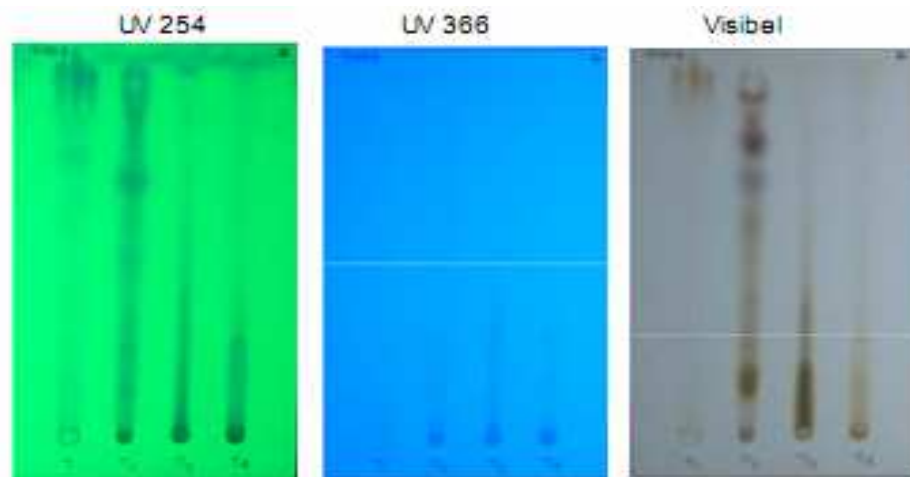
Gambar 13. Identifikasi senyawa terpenoid dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : methanol (2 : 8) dan pereaksi Lieberman-burchad

Pada identifikasi kualitatif adanya flavonoid dengan TLC, menggunakan fase diam sellulosa dan fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100 :11:11:27) dengan pereaksi amoniak dan pembanding rutin Warna spot di bawah sinar UV 254 nm meredam. Sedangkan dengan pereaksi ammonia memberikan warna spot kuning. Flavonoid terdeteksi pada kelompok T1 dengan Rf. 0.96, kelompok T2 dengan Rf. 0.78, kelompok T3 dengan Rf. 0.39, 0.78, kelompok T4 dengan Rf. 0.55.



Gambar 14 . Identifikasi senyawa flavonoid dengan fase diam sellulosa dan fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100 :11:11:27) dan pereaksi amoniak

Pada identifikasi kualitatif glikosida dengan TLC menggunakan fase diam Silika gel 60 F₂₅₄ fase gerak kloroform : metanol : air (3 : 1 :0,1) dan pereaksi asam sulfat 10% Didapatkan Warna spot di bawah sinar UV 254 nm meredam, sedangkan dengan pereaksi semprot didapatkan bercak warna hitam kelabu terdeteksi pada kelompok fraksi T1 dengan harga Rf sebesar Rf. 0,98. Sedangkan pada kelompok T2 Rf 0,16 dan 0,59, T3 Rf 0,16 dan Rf 0,34 dan T4 Rf 0,16.



Tabel 15. Identifikasi kandungan glikosida dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ fase gerak kloroform : metanol : air (3 : 1 :0,1) dan pereaksi asam sulfat 10%

Fraksi metanol ditentukan kandungan senyawa yang terdapat di dalamnya. secara analisis kimia. Fraksi di tes kandungan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, glikosida, dengan menggunakan fase gerak yang berbeda-beda, dan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan

selulosa untuk flavonoid. Analisis kimia menunjukkan fraksi metanol kelompok T1 mengandung steroid, terpen, flavonoid dan glikosida dan kadar fenol total 33,87% dan alkaloid negatif. Kelompok T2 mengandung senyawa Flavonoid, glikosida, alkaloid, terpen dengan kadar fenol total 29,05%. Kelompok T3 mengandung senyawa Flavonoid, glikosida, alkaloid, terpen dengan kadar fenol total 20,52%. Kelompok T4 mengandung senyawa Flavonoid, glikosida, alkaloid, dengan kadar fenol total 16, 63%.

Tabel 6. Data kandungan senyawa tiap sub fraksi

Kelompok sub fraksi	Flavonoid	Glikosida	Alkaloid	Terpen	steroid	Total fenol (%)
Fase diam dan fase gerak	fase diam selulosa dan fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100 :11:11:27)	fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform : metanol : air (3 : 1 :0,1)	fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak metanol : amoniak (100 : 1,5).	fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak kloroform : methanol (2 : 8)	fase diam silika gel 60 F ₂₅₄ dan fase gerak toluen : etil asetat (93 : 7)	-
Deteksi	Amonia	Asam sulfat	Dragendorff	Lieberman-burchad	vanillin-asam sulfat	-
Kelompok sub fraksi						
T1	Positif (Rf 0,96)	Positif (Rf 0,98)	-	Positif (Rf. 0.83)	Positif (Rf 0,31)	33,87
T2	Positif (Rf 0,78)	Positif (Rf 0,16 dan 0,59)	Positif (0,69)	Positif (Rf 0,83)	-	29,05
T3	Positif (Rf 0,38 dan Rf 0,78)	Positif (Rf 0,16 dan 0,34)	Positif Rf (0,63)	Positif (Rf 0,67)	-	20,52
T4	Positif (Rf 0,55)	Positif (Rf 0,16)	Positif (Rf 0,15)	-	-	16,63

4. Pembahasan

Pemaparan organisme atau infeksi bakteri akan menghasilkan aktivasi bermacam respon imun diantaranya fagositosis. Sebagai awal proses fagositosis kontak antara antigen dengan sel fagosit sangat penting (Bisayi *et al.*, 2002). Banyak antigen yang dapat menyebabkan respon imun diantaranya virus. Penelitian ini juga menunjukkan

aktifitas respon imun yang ditunjukkan dengan adanya fagositosis makrofag dengan pemaparan vaksin hepatitis B.

Aktifitas brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) sebagai imunostimulan dan hepatoprotektor sudah banyak diteliti. Kebanyakan mempunyai persamaan hasil bahwa yang mempunyai aktifitas imun aktif adalah ekstrak polar. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini diperkirakan juga memberikan efek imunstimulan yang tinggi adalah fraksi polar. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh peneliti pada identifikasi fraksi kasar, fraksi metanol adalah yang paling aktif. Ini dibuktikan dengan *Hemagglutination Test* menunjukkan adanya aglutinasi pada plate, sedangkan pada fraksi heksan dan etil asetat tidak. Fraksi metanol yang aktif dipisahkan senyawanya dengan kromatografi kolom dengan fase gerak kloroform : methanol. Hasil didapatkan 4 macam fraksi yaitu kelompok fraksi T1 (berat 366 mg), T2 (berat 519 mg), T3 (berat 101 mg) dan T4 (berat 929 mg). Berikut identifikasi kandungan senyawa dan uji aktifitas imunomodulator dan hepatoprotektor dari brotowali.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa

Uji Kandungan senyawa	Kelompok					
	Kelompok T1	Kelompok T2	Kelompok T3	Kelompok T4	Kontrol positif	Kontrol negatif
Flavonoid	Rf 0,96	Rf 0,78	Rf 0,38 dan Rf 0,78	Rf 0,55	#	#
Glikosida Jantung	Rf 0,98	Rf 0,16 dan 0,59	Rf 0,16 dan Rf 0,34	Rf 0,15	#	#
Alkaloid	-	0,69	Rf 0,63	Rf 0,16	#	#
Terpen	Rf 0,83	0,83	Rf 0,67	-	#	#
Steroid	Rf 0,31	-	-	-	#	#
Total fenol	33,87	29,05	20,52	16, 63	#	#

Tabel 8. Hasil identifikasi uji aktifitas

Uji Aktifitas	Kelompok					
	Kelompok T1	Kelompok T2	Kelompok T3	Kelompok T4	Kontrol positif	Kontrol negatif
Uji fungsi makrofag (Rata-rata IF)	328.66 ± 35, 82 *	260.43 ± 42, 35	221.19 ± 45, 39	291.04 ± 23, 64	296.53 ± 40, 97	170.69 ± 29, 47
Uji ALT	3.60 ± 0.89	5.20 ± 1.64	11.80 ± 8.64 *	-2.80 ± 2.17	1.60 ± 4.62	-21.26 ± 6.40
Uji Histologi hati	48.30 ± 2.45 *	41.06 ± 5.46	46.95 ± 3.25	48.28 ± 5.52	45.90 ± 3.34	65.52 ± 8.62

Keterangan :

K+ = Kontrol positif

K- = Kontrol positif

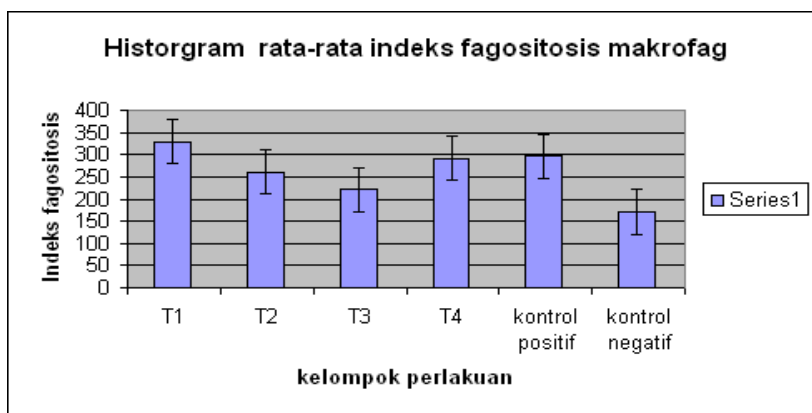
= Tidak dilakukan uji identifikasi senyawa

* = Aktifitas yang paling besar

Penelitian uji aktifitas imunomodulator dilanjutkan dengan menggunakan uji makrofag untuk mengetahui kemampuan fagositosis sel makrofag terhadap lateks dengan pemberian keempat macam fraksi. Hasil yang didapatkan menunjukkan fraksi yang paling aktif sebagai imunostimulan adalah fraksi T1 dengan dosis pemberian 0,3416 mg/20 gram mencit. Berdasarkan analisa kualitatif dengan TLC diketahui kandungan senyawa yang ada didalamnya adalah flavonoid, glikosida, terpen, steroid dengan total fenol di dalmnya 33, 87. Keempat senyawa ini diperkirakan bertanggung jawab dalam meningkatkan efek imunostimulan dari brotowali. Fraksi aktif nomer dua sebagai imunostimulan adalah kelompok fraksi T4 dengan dosis pemberian 0,8671 mg/20 gram mencit, walaupun secara statistik dengan ANOVA satu jalan pada uji Tukey tidak berbeda secara signifikan tetapi rata-rata kemampuan fagositosis makrofag dari kedua kelompok ini berbeda. Rata-rata kemampuan fagositosis makrofag kelompok T1 adalah 328,664 sedangkan kelompok T4 291,042. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia yang ada

didalamnya adalah flavonoid, glikosida, alkaloid dan total fenol 16,63. Berdasarkan data diatas ada perbedaan kandungan senyawa kimia yaitu pada fraksi T1 terdapat senyawa terpen dan steroid sedangkan pada fraksi T4 tidak. Fraksi T4 mengandung senyawa alkaloid sedangkan pada T1 tidak. Jadi kandungan senyawa yang diperkirakan paling aktif sebagai imunstimulan adalah senyawa flavonoid, glikosida, dan terpen. Glikosida juga aktif dalam meningkatkan sistem imunitas. Senyawa glikosida yang aktif sebagai imunostimulan pada brotowali diantaranya *cleroden furano diterpen glycoside*, *syringin*, *cordiol*, *cordioside*, *cordifoliosid A* dan *B*. *Syringin* dan *cordial* dapat meningkatkan serum IgG (Kapil dan Sharma, 1997). *Cordioside* dan *cordiofolioside A* dapat menginduksi aktifitas makrofag (Kapil dan sharman, 1997). Brotowali dalam meningkatkan respon imun diperkirakan karena kemampuannya dalam memperbaharui sitokin, selain itu brotowali juga dapat meningkatkan GM-CSF (*Granulocyte Machrophage Colony Stimulating Factor*).

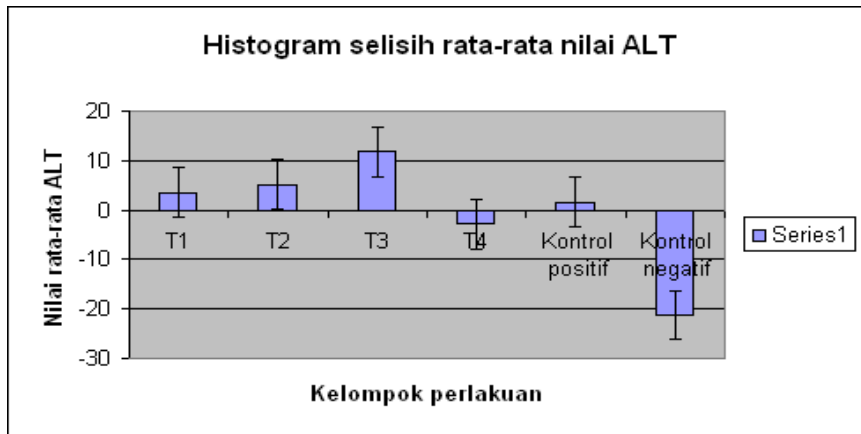
Senyawa aktif lain sebagai imunstimulan yaitu terpen. Dalam penelitian ini senyawa terpen ditemukan dalam fraksi T1, dan T2. tetapi kalau dilihat aktifitasnya antara fraksi T1 dan T2, fraksi T1 lebih bagus dalam fagositosis makrofag. Perbedaan yang nyata antara keduanya adalah adanya senyawa steroid. Pada fraksi T1 didapatkan bercak senyawa terpen denngan Rf 0,83. Besar kemungkinan senyawa ini yang menyebabkan aktifitas fagositosis makrofag berbeda antara fraksi T1 dan T2. Senyawa terpen yang aktif dalam brotowali sebagai imunstimulan salah satunya adalah *epoxy clerodane diterpen* yang dapat mencegah terjadinya *hepatoselluler carcinoma* (Dhanasekaran, 2008). Berikut adalah gambar histogram rata-rata indeks fagositosis tiap kelompok perlakuan.



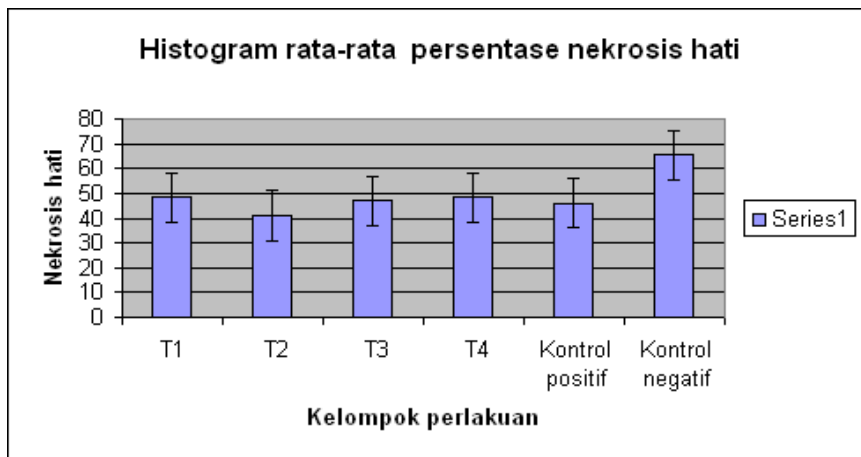
Gambar 16. Histogram Rata-rata Indeks fagositosis Makrofag

Berdasarkan hasil nilai ALT dan uji histologi hati terlihat fraksi yang memiliki aktivitas yang bagus adalah dengan uji histopatologi hati kelompok fraksi T1 dan dengan menggunakan parameter nilai ALT adalah kelompok fraksi T3. Keduanya memberikan hasil yang paling tinggi dengan uji yang berbeda. Pengujian dengan mengamati keadaan histopatologi sel hati relatif lebih spesifik dibanding dengan uji ALT. Berdasarkan identifikasi kandungan senyawa dalam brotowali, yang berkhasiat sebagai hepatoprotektor adalah flavonoid, glikosida jantung, alkaloid, terpen. Pada kelompok T1 Senyawa flavonoid yang aktif sebagai hepatoprotektor kemungkinan senyawa dengan Rf 0,96, sedangkan glikosida jantung yang aktif sebagai hepatoprotektor yang mempunyai Rf 0,98. senyawa terpen Rf 0,83 dan senyawa steroid Rf 0,31. Pada kelompok fraksi T3 senyawa yang aktif sebagai hepatoprotektor adalah flavonoid, glikosida jantung, terpen, alkaloid. Senyawa flavonoid yang aktif sebagai hepatoprotektor kemungkinan senyawa dengan Rf 0,78, sedangkan glikosida jantung yang aktif sebagai hepatoprotektor yang mempunyai Rf 0,34, senyawa terpen Rf 0,67 dan senyawa alkaloid Rf 0,63. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kesamaan senyawa antara T1 dan T2 yang mempunyai khasiat sebagai hepatoprotektor dan imunomodulator. Berikut gambar

histogram uji aktifitas ALT dan uji histopatologi sel hati dari masing-masing kelompok uji.



Gambar 17. Histogram Selisih Rata-rata Nilai ALT



Gambar 18. Histogram Persentase Rata-rata Nekrosis

Kemampuan brotowali sebagai hepatoprotektor adalah karena aktivitasnya dalam memperbaiki fungsi sel kupffer, dan kemampuan membunuh dari dari sel polymorphonuclear (Dahanukar, 2000). Brotowali juga dapat mencegah pefoksidasi lipid yagn biasa memicu terjadinya kerusakan pada sel (Meghna *et al.*, 2008).

Penelitian ini memberikan hasil bahwa brotowali (*Tinospora cordifolia* Miers) mempunyai kemampuan dalam imunomodulator dan hepatoprotektor dengan diinduksi vaksin hepatitis B. Fraksi yang aktif sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor adalah

fraksi T1. Senyawa yang dimungkinkan aktif sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor adalah terpen, steroid, flavonoid, glikosida dan alkaloid.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Pertama, ekstrak brotowali mempunyai khasiat sebagai imunomodulator yang diinduksi oleh vaksin hepatitis B.

Kedua, brotowali mempunyai efek hepatoprotektor pada kerusakan hati yang disebabkan oleh induksi vaksin hepatitis B

Senyawa aktif yang berfungsi sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor dalam brotowali adalah terpen, steroid, flavonoid, glikosida dan alkaloid.

B. Saran

Penelitian lebih lanjut tentang senyawa pada sub fraksi metanol yang memberi efek hepatoprotektor dan imunostimulan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2005, *Hepatitis B Vaccine*, di akses dari <http://www.cdc.gov.hk/publication/vip/hep-b.pdf>, diakses 5 Mei 2008-05-15
- Anonim, 1978, *Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography*, p.41, E.Merck, Darmstadt, Germany.
- Adhavaryu *et al.*, 2007, Effect of Four Indian Medicinal Herbs on Isoniazid, Rifampicin, and Pyrazinamid, induced Hepatic Injury and Immunosuppression in Guinea Pigs, India
- Angel JH, Sommer AR, Citron MK., 1979, *Toxicity of antituberculosis drug with special reference to hepatotoxicity*. Bull IUAT 1979; 54(47).
- Benjamini, E., Coic R., Sunshine., 2000, *Imunology, Ashort Course*, Edisi IV, A. John Willey & Sons, Inc, Publication, New York.
- Burgess G.W, 1994, Prinsip Dasar Elisa, dan Variasi Konfigurasi, dalam Burgesss, B.W., ELISA, dalam Diagnosis dan Penelitian, Diterjemahkan oleh Wayan T., Adana, Gajah Mada University, Yogyakarta.
- Bairy , 2004, Efficacy of *Tinospora cordifolia* on Learning and Memory in Healthy Volunteers: A Double-Blind, Randomized, Placebo Controlled Study, 1735-2657/04/32-57-60, *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutic* .
- Bairy dan karkal, 2007, Razi Institute for Drug Research (RIDR) , Safety of Aqueous Extract of *Tinospora cordifolia* (Tc) in Healthy Volunteers: A Double Blind Randomised Placebo Controlled Study, *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, IJPT 6:59-61.
- Baron, D.N Kapita Selekt Patologi Klinik, 1981, diterjemahkan oleh Andrianto dan Gunawan, Penerbit Buku Kedokteran ,Jakarta, 1981
- Bishayi *et al.*, 2002, Turki, Hepatoprotective and modulatory Properties of *Tinospora cordifolia* In CCL4 Intoxicated Mature Albino Rats, *The Journal Toxicology Sciences*, Vol 27, No. 3, 139-146
- Chandrasoma dan Taylor. 2006. *Ringkasan Patologi Anatomi*. Edisi 2. Jakarta : EGC
- Chintalwar G, Jain A, Sipahimalani A, Banerji A, Sumariwalla P, Ramakrishnan R, et al., 1999, *An immunologically active arabinogalactan from Tinospora cordifolia*. *Phytochemistry*. 1999;52:1089-93.

- Desai, 2002, An immunomodulator from *Tinospora cordifolia* with antioxidant activity in cell-free systems, *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, Vol. 114, No. 6, December 2002, pp 713–719
- Dahanukar SA, Thatte UM, Pai NR, More PB, 1988, Karandikar SM. Immunotherapeutic modification by *Tinospora cordifolia* of abdominal sepsis induced by caecal ligation in rats. *Ind J Gastroenterol.* 1988;7:21–3.
- Dahanukar *et al.*, 2000, Pharmacology Of Medicinal Plants And Natural Products, *Indian Journal Of Pharmacology*, vol 32, Mumbai, 81-118
- Dhanasekaran *et al.*, 2008, Chemopreventive potential of Epoxy clerodane diterpene from *Tinospora cordifolia* against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma., 14 Oktober 2008.
- DepKes RI., 2001, Inventaris Tanaman Obat (I), jilid 2, Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 337
- Gibbs, 2000, *Anticancer Drug Target : Growth Factor and Growth Factor Signaling*, J.Clin, Inves, 105 (1)
- Gangan VD, Pradhan P, Sipahimalani AT., 1997, Phytoecdysones from *Tinospora cordifolia*: structural elucidation of ecdysterone and makisterone A by 2D NMR spectroscopy. *Ind J Chem.* 1997;36B:787–92.
- Gregory A. Poland, M.D., and Robert M. Jacobson, M.D, 2008, Prevention of Hepatitis B with the Hepatitis B Vaccine, *n engl j med* 351;27 www.nejm.org December 30, 2004, Downloaded from www.nejm.org on November 15, 2008 .
- Horn Tom and Learned james, 2005, *Viral Hepatitis and HIV*, AIDS Community Research Initiative of America (ACRIA): www.acria.
- Hargono, Djoko 1996, Sekelumit Obat Nabati dan Sistem Imun, *Cermin Dunia Kedokteran* No. 108, 1996.
- Jagetia GC, Nayak V, Vidyasagar MS, 1998, *Evaluation of the antineoplastic activity of guduchi (Tinospora cordifolia) in cultured HeLa cells.* *Can Lett.* 1998;127:71–82.
- Jagetia GC, Rao SK., 2006, Evaluation of the antineoplastic activity of guduchi (*Tinospora cordifolia*) in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2006;29:460–6.
- Kalikar *et al.*, 2008, Immunomodulatory effect of *Tinospora cordifolia* extract in Human Immuno-deficiency virus Positive Patient, *Indian Journal Pharmacology*, Juni 2008, Vol 4, issue 3.107-110

- Kresno, R.J.B., 2001, *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratoirium*, ed IV, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kresno, S.B., 2001, *Imunologis : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, 5
- Kisworo, Heru, 2008, Pengaruh Pemberian Ekstrak Kloroform Buah Mengkudu (*Morindra citrifolia* L.) Terhadap Titer Immunoglobulin G (IgG) dan Prolifersi Limfosit pada mencit yang diinduksi vaksin Hepatitis B, skripsi, 2008.
- Karabulut AB *et al.*, 2002, A Comparison of Erythrocyte Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Patients With Hepatitis C Infection, *Turk J Med Sci*, Vol 32, hal 313-316
- Kapil and Sharma, 1997, Immunopotentiating Compound From *Tinospora cordifolia*, *Jurnal of Ethnopharmacology*, 58 :89-95
- Leeson *et al.*, 1996, Textbook of Histology, diterjemahkan oleh Siswojo *et al.*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, 1996, Jakarta.128
- Liang, Jake T, Marcghany, M.D, 2002, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Bethesda, MD 20892 *Hepatitis B e Antigen—The Dangerous Endgame Of Hepatitis B*, *N Engl J Med*, Vol. 347, No. 3·July 18, 2002· 2008 .
- Mangkuwijoyo, 2003, Pedoman Workshop Teknologi Dasar Antiibodi Monoklonal, Laboratorium Ilmu Hayati, UGM, Yogyakarta.
- Meghna *et al.*, 2008, Prevention of hepatotoxicity due to anti tuberculosis treatment: A novel integrative approach, 14 Aguatua 2008, *World Journal of Gastroenterology*, , 4753-4762
- Manjrekar PN, Jolly CI, Narayanan S, 2000, Comparative studies of the immunomodulatory activity of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*, *Fitoterapia* 71: 254-257.
- Metiani R, 2008, Uji Aktivitas Immunostimulator Ekstrak Etanol Jamur Merang (*Volvariella volvaceae*) Terhadap Proliferasi limfosit Pada Mencit balb/c Yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, Skripsi.
- Nagarkatti DS *et al.*, 1994, Modulation of Kupffer Cells Activity by *Tinospora cordifolia* in Liver Damage, *Journal Post Grad Med*, 40, hal 62-67
- Price and Willson. 2006. *Patofisiologi*. Ed :6 . Jakarta: EGC.

- Panchabhai *et al.*, 2008, Protective effect of *Tinospora cordifolia*, *Phyllanthus emblica* and their combination against antitubercular drugs induced hepatic damage: an experimental study, *Jurnal Inter Science*, Volume 22, Issue 5 , hal 646 – 650
Published Online: 3 Apr 2008
- Ranjith, 2008 , Enhanced Phagocytosis and Antibody Production by *Tinospora cordifolia* - A new dimension in Immunomodulation, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (2), pp. 081-085, 18 January,
- Rantam, 2003, Metode Immunology, Airlangga University Press, Surabaya
- Soedarto. 1990. *Penyakit-Penyakit Infeksi di Indonesia*. Jakarta : Widya Medika.
- Sherlock S, 1981, *Diseases of the Liver and Billiary System*. 6th ed. London: Blackwell Scient Publ.; 295.
- Stead WW, Dutt AK, 1982, *Chemotherapy of tuberculosis today*. Am. Rev. Res.Dis.; 125: 94–101.
- Singh Nisha *et al.*, 2005, *Effect of Tinospora cordifolia on Tumor Activity of Tumor-Associated macrophagesi-derive Dendritic Cells*, *Imunopharmacology Immunotoxicologi* 27 (1), hal 1-14
- Singh SS, Pandey SC, Srivastava S, Gupta VS, Patro B, Ghosh AC (2003). Chemistry and medicinal properties of *Tinospora cordifolia* (guduchi) *Indian J. Pharmacol.* 35: 83-91. Educational Forum.
- Soewignjo Soemohardjo, *et al.* 1983. *Tes faal Hati (Dasar-Dasar Teoritik dan Pemakaian dalam Klinik)*. Bandung: Penerbit Alumni.hlm 45-52. Sugiyanto, 1995, *Petunjuk Praktikum Farmakologi*, Edisi IV.
- Subramoniam A., Pushpangadan P., 1999, Educational Forum Development Of Phytomedicines For Liver Diseases, *Indian Journal of Pharmacology* 1999; 31: 166-175
- Thatte UM, Kulkarni MR, Dahanukar SA. 1992, *Immunotherapeutic modification of Escherichia coli peritonitis and bacteremia by Tinospora cordifolia*. *J Postgrad Med.* 1992;38:13.
- Thalhah MKA, 2008, Pengaruh Pemberian Ekstrak Kloroform Buah Mengkudu (*Morindra citrifolia* L.) Terhadap Titer Immunoglobulin M (IgM) dan Prolifeerasi Sel Limfosit Pada Rehat Yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B.
- Wagner, H., 1984, *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, p.164, Springer-Verlag.

Lampiran 1. Surat keterangan pengambilan bahan dan determinasi tanaman



DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL**

Jl. Raya Lawu No. 11 Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah
Telp. (0271) 697010 Fax. (0271) 697451, E-mail : b2p2to2t@gmail.com



Nomor : KS.01.02./3/1652 /2008
Lampiran : 1 (satu) berkas
Perihal : Keterangan Determinasi

22 Desember 2008

Yth. Dekan Fak. Farmasi
Universitas Setia Budi Surakarta
di tempat

Menunjuk surat Saudara nomor : 169.II/PPs/XII/2008 tanggal 2 Desember 2008 perihal seperti pada pokok surat, dengan ini kami beritahukan bahwa mahasiswa Saudara

No	Nama/NIM	Determinasi tanaman
1	Rini Prastiwi, S.Si., Apt. SBF.010710014	<i>Tinospora cordifolia</i> (L.) Miers.

telah melakukan determinasi tanaman tersebut di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T) Tawangmangu. Untuk itu, setelah selesai penelitian mahasiswa yang bersangkutan diwajibkan menyerahkan 1 (satu) ekspl. hasil penelitian kepada Kepala B2P2TO2T

Demikian, atas perhatian Saudara kami sampaikan terimakasih



An. Kepala
Kepala Bidang Pelayanan Penelitian

Dr. Katno, M.Si
NIP. 140168949

Tembusan :

1. Kepala B2P2TO2T (sebagai laporan)
2. Mahasiswa yang bersangkutan

SURAT KETERANGAN DETERMINASI

Nama : *Tinospora cordifolia* (L.) Miers.

Suku : Menispermaceae.

Hasil determinasi menurut C.A. Backer (1968):

1b_2b_3b_4b_12b_13b_14b_17b_18b_19b_20b_21b_22b_23b_24b_25b_26b_27a_28
b_29b_30b_31a_32a_33a_34a_35a_36d_37b_38b_39a_40b _____ **19. Menispermaceae**
1b_2b_3b_6b_10a_11a_12a _____ **9. Tinospora**
1b _____ *Tinospora cordifolia* (L.) Miers.

Deskripsi tanaman :

Habitus; Semak, memanjat, tahunan, tinggi 2-5 m. Batang; Bulat, berkayu, permukaan berbenjol-benjol, bercabang, hijau. Daun; Tunggal, tersebar, bentuk jantung, ujung runcing, tepi rata, pangkal berlekuk, panjang 7-12 cm, lebar 7-11 cm, bertangkai, pertulangan menjari, tangkai daun menebal pada pangkal dan ujung, hijau. Bunga; Majemuk, bentuk tandan, panjang 7-25 cm, terletak pada batang, kelopak tiga, bulat telur, kecil, hijau, mahkota 3, bentuk benang, bulat telur, hijau, benang sari 6, panjang tangkai 2-3 mm, hijau muda, kepala sari kuning, Buah; Batu, kecil, hijau. Akar; Tunggang, putih kotor.

Tawangmangu, Desember 2008
Penanggung jawab,
Instalasi Sistimatika Tumbuhan Obat



Supriyati
NIP. 140 219199

Lampiran 2. Surat keterangan pembelian mencit balb/c



Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik
Fakultas Farmasi
Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telp. (0274) 902660 Fax (0274) 543120

SURAT KETERANGAN

Nomor : FA/FFK/004/Kandang/VII/2009

Yang bertanda tangan di bawah ini Kepala Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi UGM menerangkan bahwa :

Nama : Rini Prastiwi
No. Mhs : -
Institusi : Fak. Farmasi Univ. Setia Budi Surakarta

Telah melakukan pembelian mencit galur Balb-c jenis kelamin jantan umur 2 bulan sebanyak 25 ekor dalam keadaan sehat. Mencit tersebut digunakan untuk penelitian .

Pembelian dilakukan pada tanggal 15 Juni 2009.

Demikian, semoga surat keterangan ini dapat digunakan sebaik-baiknya.

Yogyakarta, 23 Juli 2009
Kepala Bagian,

Dra. Nurlaila, M.Si., Apt.
NIP. 130 885 708

Lampiran 3. Berat tiap fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom vakum

Fraksi metanol sebanyak 3 gram dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum dengan campuran fase gerak kloroform : metanol. Didapatkan 4 kelompok fraksi. Berikut berat dari masing-masing kelompok fraksi

Kelompok Fraksi	Berat (gram)
T1	0,366 gram
T2	0,591 gram
T3	0,101 gram
T4	0,929 gram

Lampiran 4. Penentuan dosis

Dosis Kontrol Positif hepatoprotektor (Curcuma[®])

Tiap tablet mengandung 200 mg Curcuma.

Dosis pemakaian pada manusia = 1 tablet/hari = 200 mg/hari

Dosis pemakaian pada mencit = faktor konversi manusia ke mencit x dosis pemakaian pada manusia

Dosi mencit = $0,0026 \times 200 \text{ mg} = 0,52 \text{ mg}/20 \text{ gram mencit}$

Dosis Kontrol Positif untuk imunomodulator (Imboost[®])

Tiap tablet mengandung 250 mg Echinaceae.

Dosis pemakaian pada manusia = 1 tablet/hari = 250 mg/hari

Dosis pemakaian pada mencit = faktor konversi manusia ke mencit x dosis pemakaian pada manusia

Dosi mencit = $0,0026 \times 250 \text{ mg} = 0,65 \text{ mg}/20 \text{ gram mencit}$

Dosis masing-masing fraksi metanol

Dosis ekstrak brotowali = 100 mg/kg BB tikus (Bishayi, 2002)

Dosis fraksi = $100/1000 \times 200 \text{ mg} = 20 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus}$

Konversi dosis tikus ke mencit = $0,14 \times 20 \text{ mg} = 2,8 \text{ mg}/20 \text{ BB mencit}$ (dosis ini

digunakan untuk uji pendahuluan mencari fraksi aktif dari heksan, etil asetat, kloroform)

Fraksi yang aktif dengan uji aktifitas = fraksi metanol.

Kelompok dosis untuk tiap kelompok perlakuan :

Kelompok perlakuan	Berat tiap fraksi	Dosis Pemberian /20 gram mencit
T1	0,366 gram	$0,366/3 \times 2,8 \text{ mg} = 0,3416 \text{ mg}$
T2	0,591 gram	$0,519/3 \times 2,8 \text{ mg} = 0,4844 \text{ mg}$
T3	0,101 gram	$0,101/3 \times 2,8 \text{ mg} = 0,0942 \text{ mg}$
T4	0,929 gram	$0,929/3 \times 2,8 \text{ mg} = 0,8671 \text{ mg}$

Dosis Pemberian Vaksin Hepatitis B

Vaksin hepatitis B Engerix[®] mengandung HbsAg 20 µg/1 ml.

Dosis untuk mencit berat 20 gram

Dosis pemakaian pada mencit = faktor konversi manusia ke mencit x dosis pemakaian

$$= 0,0026 \times 20 \text{ µg} = 0,052 \text{ µg/20 gram mencit}$$

$$= 0,052 \text{ µg} \times 10 = 0,52 \text{ µg/20 gram mencit}$$

Lampiran 5. Data pengamatan uji makrofag

Kelompok	Replikasi	Indek Fagositosis makrofag
Kelompok T1	1	303.38
	2	387.10
	3	310.98
	4	338.92
	5	302.94
Kelompok T2	1	261.63
	2	260.26
	3	273.60
	4	312.05
	5	194.60
Kelompok T3	1	191.06
	2	224.22
	3	283.72
	4	166.14
	5	240.81
Kelompok T4	1	284.66
	2	276.34
	3	328.32
	4	298.08
	5	267.81
Kelompok kontrol positif	1	277.60
	2	319.60
	3	237.00
	4	304.88
	5	343.56
Kelompok kontrol negatif	1	121.44
	2	189.61
	3	191.78
	4	165.24
	5	185.40

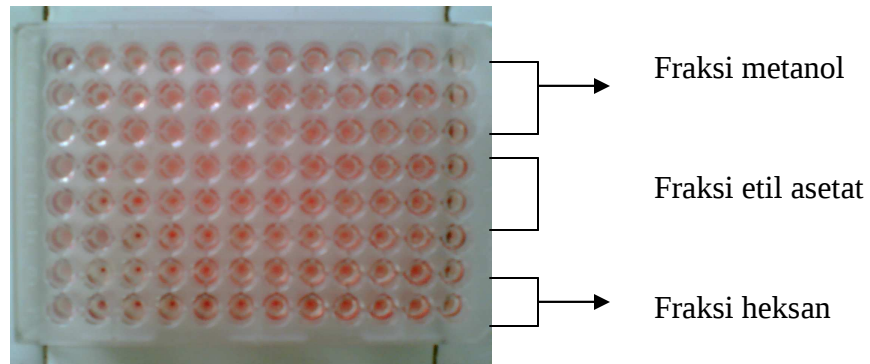
Lampiran 6. Data pengamatan aktivitas enzim ALT

Kelompok	Replikasi	Selisih nilai ALT (U/L)
Kelompok T1	1	5
	2	3
	3	3
	4	4
	5	3
Kelompok T2	1	4
	2	5
	3	8
	4	5
	5	4
Kelompok T3	1	9
	2	10
	3	6
	4	7
	5	27
Kelompok T4	1	-2
	2	0
	3	-5
	4	-5
	5	-2
Kelompok kontrol positif	1	-1
	2	-4
	3	8
	4	1
	5	4
Kelompok kontrol negatif	1	-14
	2	-23
	3	-31
	4	-17
	5	-21

Lampiran 7. Data pengamatan persentase nekrosis hati

Kelompok	Replikasi	Nekrosis hati (%)
Kelompok T1	1	48.72
	2	46.15
	3	50.00
	4	51.16
	5	45.45
Kelompok T2	1	43.18
	2	45.65
	3	37.50
	4	33.33
	5	45.65
Kelompok T3	1	50.00
	2	45.31
	3	47.06
	4	42.37
	5	50.00
Kelompok T4	1	52.08
	2	41.67
	3	44.78
	4	55.42
	5	47.44
Kelompok kontrol positif	1	43.48
	2	46.51
	3	47.83
	4	41.67
	5	50.00
Kelompok kontrol negatif	1	72.88
	2	76.74
	3	60.00
	4	58.00
	5	60.00

Lampiran 8. Hasil tes hemagglutination



Gambar 19. Hasil Hemagglutination test

	Heksan			Etil Asetat			Metanol		
Lubang									
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan = (-) tidak terjadi aglutinasi (terdapat endapan)
 (+) terjadi aglutinasi

Lampiran 9. Hasil analisa uji makrofag dengan metode *Tukey HSD*

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Makrofag_fagosit
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	261.4243
	Std. Deviation	63.07837
Most Extreme Differences	Absolute	.126
	Positive	.122
	Negative	-.126
Kolmogorov-Smirnov Z		.690
Asymp. Sig. (2-tailed)		.728

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

Makrofag_fagosit								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	5	328.6640	35.82485	16.02136	284.1816	373.1464	302.94	387.10
T2	5	260.4280	42.34717	18.93823	207.8470	313.0090	194.60	312.05
T3	5	221.1900	45.39396	20.30080	164.8260	277.5540	166.14	283.72
T4	5	291.0420	23.64206	10.57305	261.6865	320.3975	267.81	328.32
Kontrol positif	5	296.5280	40.97540	18.32476	245.6503	347.4057	237.00	343.56
Kontrol negatif	5	170.6940	29.47204	13.18029	134.0996	207.2884	121.44	191.78
Total	30	261.4243	63.07837	11.51648	237.8705	284.9782	121.44	387.10

Test of Homogeneity of Variances

Makrofag_fagosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.393	5	24	.849

ANOVA

Makrofag_fagosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	82412.170	5	16482.434	11.996	.000
Within Groups	32975.382	24	1373.974		
Total	115387.6	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Makrofag_fagosit

Tukey HSD

(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T1	T2	68.2360	23.44333	.073	-4.2492	140.7212
	T3	107.4740*	23.44333	.001	34.9888	179.9592
	T4	37.6220	23.44333	.603	-34.8632	110.1072
	Kontrol positif	32.1360	23.44333	.743	-40.3492	104.6212
	Kontrol negatif	157.9700*	23.44333	.000	85.4848	230.4552
T2	T1	-68.2360	23.44333	.073	-140.7212	4.2492
	T3	39.2380	23.44333	.561	-33.2472	111.7232
	T4	-30.6140	23.44333	.779	-103.0992	41.8712
	Kontrol positif	-36.1000	23.44333	.643	-108.5852	36.3852
	Kontrol negatif	89.7340*	23.44333	.009	17.2488	162.2192
T3	T1	-107.4740*	23.44333	.001	-179.9592	-34.9888
	T2	-39.2380	23.44333	.561	-111.7232	33.2472
	T4	-69.8520	23.44333	.064	-142.3372	2.6332
	Kontrol positif	-75.3380*	23.44333	.038	-147.8232	-2.8528
	Kontrol negatif	50.4960	23.44333	.295	-21.9892	122.9812
T4	T1	-37.6220	23.44333	.603	-110.1072	34.8632
	T2	30.6140	23.44333	.779	-41.8712	103.0992
	T3	69.8520	23.44333	.064	-2.6332	142.3372
	Kontrol positif	-5.4860	23.44333	1.000	-77.9712	66.9992
	Kontrol negatif	120.3480*	23.44333	.000	47.8628	192.8332
Kontrol positif	T1	-32.1360	23.44333	.743	-104.6212	40.3492
	T2	36.1000	23.44333	.643	-36.3852	108.5852
	T3	75.3380*	23.44333	.038	2.8528	147.8232
	T4	5.4860	23.44333	1.000	-66.9992	77.9712
	Kontrol negatif	125.8340*	23.44333	.000	53.3488	198.3192
Kontrol negatif	T1	-157.9700*	23.44333	.000	-230.4552	-85.4848
	T2	-89.7340*	23.44333	.009	-162.2192	-17.2488
	T3	-50.4960	23.44333	.295	-122.9812	21.9892
	T4	-120.3480*	23.44333	.000	-192.8332	-47.8628
	Kontrol positif	-125.8340*	23.44333	.000	-198.3192	-53.3488

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

Homogeneous Subsets

Makrofag_fagosit

Tukey HSD^a

Kelompok_perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol negatif	5	170.6940		
T3	5	221.1900	221.1900	
T2	5		260.4280	260.4280
T4	5		291.0420	291.0420
Kontrol positif	5			296.5280
T1	5			328.6640
Sig.		.295	.064	.073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 10. Hasil analisa uji ALT dengan metode *Dunett T3*

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KADAR
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	-.31
	Std. Deviation	11.425
Most Extreme Differences	Absolute	.181
	Positive	.150
	Negative	-.181
Kolmogorov-Smirnov Z		.989
Asymp. Sig. (2-tailed)		.281

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

KADAR								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kelompok T1	5	3.60	.894	.400	2.49	4.71	3	5
Kelompok T2	5	5.20	1.643	.735	3.16	7.24	4	8
Kelompok T3	5	11.80	8.643	3.865	1.07	22.53	6	27
Kelompok T4	5	-2.80	2.168	.970	-5.49	-.11	-5	0
Kontrol positif	5	1.60	4.615	2.064	-4.13	7.33	-4	8
Kontrol negatif	5	-21.26	6.396	2.861	-29.20	-13.32	-31	-14
Total	30	-.31	11.425	2.086	-4.58	3.96	-31	27

Test of Homogeneity of Variances

KADAR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.671	5	24	.047

ANOVA

KADAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3205.255	5	641.051	26.506	.000
Within Groups	580.452	24	24.186		
Total	3785.707	29			

Oneway

Descriptives

KADAR

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kelompok T1	5	3.60	.894	.400	2.49	4.71	3	5
Kelompok T2	5	5.20	1.643	.735	3.16	7.24	4	8
Kelompok T3	5	11.80	8.643	3.865	1.07	22.53	6	27
Kelompok T4	5	-2.80	2.168	.970	-5.49	-.11	-5	0
Kontrol positif	5	1.60	4.615	2.064	-4.13	7.33	-4	8
Kontrol negatif	5	-21.26	6.396	2.861	-29.20	-13.32	-31	-14
Total	30	-.31	11.425	2.086	-4.58	3.96	-31	27

Test of Homogeneity of Variances

KADAR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.671	5	24	.047

ANOVA

KADAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3205.255	5	641.051	26.506	.000
Within Groups	580.452	24	24.186		
Total	3785.707	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KADAR

Dunnett T3

(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok T1	Kelompok T2	-1.60	.837	.616	-5.14	1.94
	Kelompok T3	-8.20	3.886	.539	-28.04	11.64
	Kelompok T4	6.40*	1.049	.013	1.70	11.10
	Kontrol positif	2.00	2.102	.983	-8.44	12.44
	Kontrol negatif	24.86*	2.888	.007	10.26	39.46
Kelompok T2	Kelompok T1	1.60	.837	.616	-1.94	5.14
	Kelompok T3	-6.60	3.934	.740	-26.16	12.96
	Kelompok T4	8.00*	1.217	.003	3.17	12.83
	Kontrol positif	3.60	2.191	.758	-6.50	13.70
	Kontrol negatif	26.46*	2.953	.004	12.18	40.74
Kelompok T3	Kelompok T1	8.20	3.886	.539	-11.64	28.04
	Kelompok T2	6.60	3.934	.740	-12.96	26.16
	Kelompok T4	14.60	3.985	.132	-4.72	33.92
	Kontrol positif	10.20	4.382	.413	-8.41	28.81
	Kontrol negatif	33.06*	4.809	.002	13.89	52.23
Kelompok T4	Kelompok T1	-6.40*	1.049	.013	-11.10	-1.70
	Kelompok T2	-8.00*	1.217	.003	-12.83	-3.17
	Kelompok T3	-14.60	3.985	.132	-33.92	4.72
	Kontrol positif	-4.40	2.280	.609	-14.36	5.56
	Kontrol negatif	18.46*	3.020	.016	4.41	32.51
Kontrol positif	Kelompok T1	-2.00	2.102	.983	-12.44	8.44
	Kelompok T2	-3.60	2.191	.758	-13.70	6.50
	Kelompok T3	-10.20	4.382	.413	-28.81	8.41
	Kelompok T4	4.40	2.280	.609	-5.56	14.36
	Kontrol negatif	22.86*	3.527	.003	8.74	36.98
Kontrol negatif	Kelompok T1	-24.86*	2.888	.007	-39.46	-10.26
	Kelompok T2	-26.46*	2.953	.004	-40.74	-12.18
	Kelompok T3	-33.06*	4.809	.002	-52.23	-13.89
	Kelompok T4	-18.46*	3.020	.016	-32.51	-4.41
	Kontrol positif	-22.86*	3.527	.003	-36.98	-8.74

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

Lampiran 11. Hasil analisa uji histologi hati dengan metode *Dunett T3*

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Nekrosis_sel
N		30
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	49.3343
	Std. Deviation	9.09864
Most Extreme Differences	Absolute	.204
	Positive	.204
	Negative	-.133
Kolmogorov-Smirnov Z		1.118
Asymp. Sig. (2-tailed)		.164

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

Nekrosis_sel								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	5	48.2960	2.44903	1.09524	45.2551	51.3369	45.45	51.16
T2	5	41.0620	5.45566	2.43985	34.2879	47.8361	33.33	45.65
T3	5	46.9480	3.25127	1.45401	42.9110	50.9850	42.37	50.00
T4	5	48.2780	5.52420	2.47050	41.4188	55.1372	41.67	55.42
kontrol positif	5	45.8980	3.34127	1.49426	41.7493	50.0467	41.67	50.00
kontrol negatif	5	65.5240	8.62481	3.85713	54.8149	76.2331	58.00	76.74
Total	30	49.3343	9.09864	1.66118	45.9368	52.7318	33.33	76.74

Test of Homogeneity of Variances

Nekrosis_sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.415	5	24	.002

ANOVA

Nekrosis_sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1751.169	5	350.234	12.940	.000
Within Groups	649.604	24	27.067		
Total	2400.773	29			

Oneway

Descriptives

Nekrosis_sel

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
T1	5	48.2960	2.44903	1.09524	45.2551	51.3369	45.45	51.16
T2	5	41.0620	5.45566	2.43985	34.2879	47.8361	33.33	45.65
T3	5	46.9480	3.25127	1.45401	42.9110	50.9850	42.37	50.00
T4	5	48.2780	5.52420	2.47050	41.4188	55.1372	41.67	55.42
kontrol positif	5	45.8980	3.34127	1.49426	41.7493	50.0467	41.67	50.00
kontrol negatif	5	65.5240	8.62481	3.85713	54.8149	76.2331	58.00	76.74
Total	30	49.3343	9.09864	1.66118	45.9368	52.7318	33.33	76.74

Test of Homogeneity of Variances

Nekrosis_sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.415	5	24	.002

ANOVA

Nekrosis_sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1751.169	5	350.234	12.940	.000
Within Groups	649.604	24	27.067		
Total	2400.773	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Nekrosis_sel

Dunnett T3

(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T1	T2	7.2340	2.67440	.287	-4.5553	19.0233
	T3	1.3480	1.82036	.999	-5.8886	8.5846
	T4	.0180	2.70239	1.000	-11.9259	11.9619
	kontrol positif	2.3980	1.85266	.921	-4.9972	9.7932
	kontrol negatif	-17.2280	4.00961	.074	-36.3755	1.9195
T2	T1	-7.2340	2.67440	.287	-19.0233	4.5553
	T3	-5.8860	2.84025	.529	-17.6669	5.8949
	T4	-7.2160	3.47221	.516	-20.7259	6.2939
	kontrol positif	-4.8360	2.86106	.736	-16.6367	6.9647
	kontrol negatif	-24.4620*	4.56402	.013	-43.1649	-5.7591
T3	T1	-1.3480	1.82036	.999	-8.5846	5.8886
	T2	5.8860	2.84025	.529	-5.8949	17.6669
	T4	-1.3300	2.86662	1.000	-13.2514	10.5914
	kontrol positif	1.0500	2.08494	1.000	-7.0636	9.1636
	kontrol negatif	-18.5760	4.12209	.053	-37.3890	-.2370
T4	T1	-.0180	2.70239	1.000	-11.9619	11.9259
	T2	7.2160	3.47221	.516	-6.2939	20.7259
	T3	1.3300	2.86662	1.000	-10.5914	13.2514
	kontrol positif	2.3800	2.88724	.997	-9.5592	14.3192
	kontrol negatif	-17.2460	4.58048	.073	-35.9703	1.4783
kontrol positif	T1	-2.3980	1.85266	.921	-9.7932	4.9972
	T2	4.8360	2.86106	.736	-6.9647	16.6367
	T3	-1.0500	2.08494	1.000	-9.1636	7.0636
	T4	-2.3800	2.88724	.997	-14.3192	9.5592
	kontrol negatif	-19.6260*	4.13646	.042	-38.4080	-.8440
kontrol negatif	T1	17.2280	4.00961	.074	-1.9195	36.3755
	T2	24.4620*	4.56402	.013	5.7591	43.1649
	T3	18.5760	4.12209	.053	-.2370	37.3890
	T4	17.2460	4.58048	.073	-1.4783	35.9703
	kontrol positif	19.6260*	4.13646	.042	.8440	38.4080

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

Lampiran 12. Kadar ALT Orientasi dengan metode *Tukey HSD*

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KADAR
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	-3.2000
	Std. Deviation	8.14336
Most Extreme Differences	Absolute	.213
	Positive	.122
	Negative	-.213
Kolmogorov-Smirnov Z		.823
Asymp. Sig. (2-tailed)		.507

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

KADAR								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Fraksi heksan	3	-1.6667	6.65833	3.84419	-18.2069	14.8735	-9.00	4.00
Fraksi etil asetat	3	-10.6667	15.01111	8.66667	-47.9563	26.6230	-28.00	-2.00
Fraksi metanol	3	2.6667	5.13160	2.96273	-10.0809	15.4143	-3.00	7.00
Kontrol positif	3	-1.0000	3.00000	1.73205	-8.4524	6.4524	-4.00	2.00
Kontrol negatif	3	-5.3333	2.51661	1.45297	-11.5849	.9183	-8.00	-3.00
Total	15	-3.2000	8.14336	2.10261	-7.7096	1.3096	-28.00	7.00

Test of Homogeneity of Variances

KADAR			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.547	4	10	.013

ANOVA

KADAR					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	305.733	4	76.433	1.228	.359
Within Groups	622.667	10	62.267		
Total	928.400	14			

Oneway

Descriptives

KADAR

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Fraksi heksan	3	-1.6667	6.65833	3.84419	-18.2069	14.8735	-9.00	4.00
Fraksi etil asetat	3	-10.6667	15.01111	8.66667	-47.9563	26.6230	-28.00	-2.00
Fraksi metanol	3	2.6667	5.13160	2.96273	-10.0809	15.4143	-3.00	7.00
Kontrol positif	3	-1.0000	3.00000	1.73205	-8.4524	6.4524	-4.00	2.00
Kontrol negatif	3	-5.3333	2.51661	1.45297	-11.5849	.9183	-8.00	-3.00
Total	15	-3.2000	8.14336	2.10261	-7.7096	1.3096	-28.00	7.00

Test of Homogeneity of Variances

KADAR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.547	4	10	.013

ANOVA

KADAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	305.733	4	76.433	1.228	.359
Within Groups	622.667	10	62.267		
Total	928.400	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KADAR

Tukey HSD

(I) kelompok perlakuan	(J) kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Fraksi heksan	Fraksi etil asetat	9.0000	6.44291	.643	-12.2042	30.2042
	Fraksi metanol	-4.3333	6.44291	.958	-25.5375	16.8708
	Kontrol positif	-.6667	6.44291	1.000	-21.8708	20.5375
	Kontrol negatif	3.6667	6.44291	.977	-17.5375	24.8708
Fraksi etil asetat	Fraksi heksan	-9.0000	6.44291	.643	-30.2042	12.2042
	Fraksi metanol	-13.3333	6.44291	.303	-34.5375	7.8708
	Kontrol positif	-9.6667	6.44291	.584	-30.8708	11.5375
	Kontrol negatif	-5.3333	6.44291	.916	-26.5375	15.8708
Fraksi metanol	Fraksi heksan	4.3333	6.44291	.958	-16.8708	25.5375
	Fraksi etil asetat	13.3333	6.44291	.303	-7.8708	34.5375
	Kontrol positif	3.6667	6.44291	.977	-17.5375	24.8708
	Kontrol negatif	8.0000	6.44291	.729	-13.2042	29.2042
Kontrol positif	Fraksi heksan	.6667	6.44291	1.000	-20.5375	21.8708
	Fraksi etil asetat	9.6667	6.44291	.584	-11.5375	30.8708
	Fraksi metanol	-3.6667	6.44291	.977	-24.8708	17.5375
	Kontrol negatif	4.3333	6.44291	.958	-16.8708	25.5375
Kontrol negatif	Fraksi heksan	-3.6667	6.44291	.977	-24.8708	17.5375
	Fraksi etil asetat	5.3333	6.44291	.916	-15.8708	26.5375
	Fraksi metanol	-8.0000	6.44291	.729	-29.2042	13.2042
	Kontrol positif	-4.3333	6.44291	.958	-25.5375	16.8708

Homogeneous Subsets

KADAR

Tukey HSD^a

kelompok perlakuan	N	Subset for alpha = .05
		1
Fraksi etil asetat	3	-10.6667
Kontrol negatif	3	-5.3333
Fraksi heksan	3	-1.6667
Kontrol positif	3	-1.0000
Fraksi metanol	3	2.6667
Sig.		.303

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

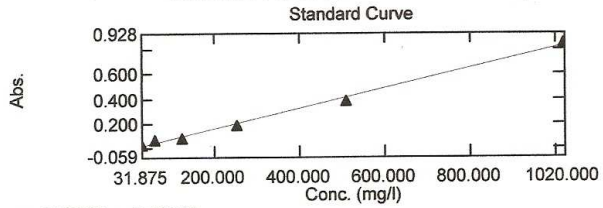
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 13. Hasil data uji total fenol

Standard Table Report

09/25/2009 12:54:59 PM

File Name: D:\Data Analisa\Anif445-T1-4.pho



$y = 0.00082x - 0.00276$
Correlation Coefficient $r^2 = 0.99530$

Standard Table

	Sample ID	Ex	Conc	WL760.0
1	STD 1		31.875	0.037
2	STD 1-2		31.875	0.037
3	STD 1-3		31.875	0.037
4	STD 1-Avg		31.875	0.037
5	STD 2		63.750	0.075
6	STD 2-2		63.750	0.075
7	STD 2-3		63.750	0.075
8	STD 2-Avg		63.750	0.075
9	STD 3		127.50	0.088
10	STD 3-2		127.50	0.088
11	STD 3-3		127.50	0.088
12	STD 3-Avg		127.50	0.088
13	STD 4		255.00	0.187
14	STD 4-2		255.00	0.187
15	STD 4-3		255.00	0.187
16	STD 4-Avg		255.00	0.187
17	STD 5		510.00	0.389
18	STD 5-2		510.00	0.389
19	STD 5-3		510.00	0.389
20	STD 5-Avg		510.00	0.389
21	STD 6		1020.0	0.846
22	STD 6-2		1020.0	0.846
23	STD 6-3		1020.0	0.845
24	STD 6-Avg		1020.0	0.846
25				

Sample Table Report

09/25/2009 12:55:09 PM

File Name: D:\Data Analisa\Anif\445-T1-4.pho

Sample Table

	Sample ID	Conc	WL760.0	Comments
1	T1		0.378	
2	T1-2		0.379	
3	T1-3		0.378	
4	T1-Avg	467.372	0.378	Avg of preceding 3 Samples
5	T2		0.571	
6	T2-2		0.571	
7	T2-3		0.570	
8	T2-Avg	703.055	0.571	Avg of preceding 3 Samples
9	T3		0.258	
10	T3-2		0.258	
11	T3-3		0.258	
12	T3-Avg	320.094	0.258	Avg of preceding 3 Samples
13	T4		0.198	
14	T4-2		0.198	
15	T4-3		0.198	
16	T4-Avg	246.157	0.198	Avg of preceding 3 Samples
17				