

**ATRAKSI LOUIS : AKTIVITAS KOMBINASI EKSTRAK SAMBILOTO
(*AndrographisPaniculata*) DAN KAYU MANIS (*Cinnamomum Verum, sin. C. zeylanicum*)
TERHADAP SISTEM IMUN HUMORAL (IgG dan IgM) PADA MENCIT BALB/C YANG
DIINDUKSI VAKSIN HEPATITIS B**

Siti Saidah, Kholidah, Lina Wahyuni, Arif Mirza Rahmatika, Maria Ulfah

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim
Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang 50236
Email : mariaulfa@unwahas.ac.id

Abstrak

Daun sambiloto dan kayu manis mengandung banyak komponen kimia yang dapat digunakan sebagai agen immunostimulan diantaranya andrographolid pada sambiloto dan sinamaldehid pada kayu manis. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek immunostimulan dari kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan kayu manis dengan melihat ekspresi sistem imun humorai (IgM dan IgG) pada mencit balb/c yang telah diinduksi vaksin hepatitis B. Ekstraksi kedua bahan tersebut menggunakan etanol 96% dengan cara soxhletasi kemudian dikentalkan dengan rotary evaporator. Pengamatan sistem imun Humoral IgG dan IgM dengan menggunakan ELISA tidak langsung. Perlakuan pada hewan uji dilakukan dengan pemberian oral pada masing-masing ekstrak 150 mg/kgBB dan kombinasi ekstrak sambiloto dan kayu manis 1:1, 1:2, dan 2:1. Data ELISA yang diperoleh adalah OD (Optical Density) yang menunjukkan jumlah imunoglobulin (IgG dan IgM) dalam serum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak sambiloto dan kayu manis dengan dosis 300 mg : 150 mg menunjukkan peningkatan IgG sedangkan kadar IgM tertinggi pada kelompok ES:EKM 1:2 (dosis 150 mg : 300 mg).

Kata kunci : hepatitis B, elisa, immunostimulan

PENDAHULUAN

Hepatitis B merupakan penyakit hati yang disebabkan oleh Virus Hepatitis B (VHB), suatu anggota famili Hepadnavirus yang dapat menyebabkan peradangan hati akut atau menahun yang pada sebagian kecil kasus dapat berlanjut menjadi sirosis hati atau kanker hati. Virus hepatitis B telah menginfeksi sejumlah 2 milyar orang di dunia dan sekitar 240 juta merupakan pengidap virus hepatitis B kronis (Anonim,2006). Di Indonesia, hepatitis B merupakan jenis hepatitis yang paling banyak menginfeksi (21,8%) dibandingkan dengan jenis hepatitis lain dengan jumlah penduduk yang telah terinfeksi hepatitis B sekitar 23 juta orang. Selain itu, infeksi virus hepatitis B diperkirakan sebagai penyebab dari 30% sirosis dan 53% kanker hati di dunia (Rahayu, 2014).

Selama ini upaya pencegahan terhadap hepatitis B telah dilakukan dengan cara pemberian vaksin hepatitis B, namun Ediati dkk., dalam penelitiannya menunjukkan bahwa vaksin

hepatitis B ini dapat menyebabkan berbagai reaksi yang berbalikan seperti adanya nekrosis pada pola histopatologinya, sudden death infant syndrome (SIDS), mielitis, multiple sclerosis, dan optic neuritis. Menurut pandangan sistem pengobatan tradisional obat-obat alam termasuk obat-obat nabati, dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan alamiah tubuh. Pemberian senyawa yang bersifat hepatoprotektif dan imunostimulan diduga dapat memperbaiki aktivitas dan mengurangi efek samping akibat pemberian vaksin hepatitis B.

Indonesia memiliki beberapa jenis tumbuhan yang memiliki khasiat meningkatkan sistem imun, seperti sambiloto (*Andrographis paniculata*, (*Burm.F* Nees) dan kayu manis (*Cinnamomum Verum, sin. C. zeylanicum*). Hasil penelitian Mamik P.R., (2015) fraksi n-Heksan dari sambiloto dapat meningkatkan sistem imun dengan melihat peningkatan sistem kekebalan tubuh humorai yaitu pada parameter

igG, dan pada penelitian Ramchandra (2006),. Kayu manis jenis *Cinnamomum zeylanicum* bark pada dosis 100 mg/kg BB memiliki efek imunostimulan pada hewan model tikus. Namun efek kombinasi ekstrak dari kedua tumbuhan tersebut belum diketahui, sehingga saintifikasi ilmiah kombinasi ekstrak etanolik sambiloto (*Andrographis paniculata*, (Burm.F) Nees) dan kayu manis (*Cinnamomum Verum*, sin. *C. zeylanicum*)sebagai imunostimulan sangat diperlukan guna menjamin kajian pengembangan kombinasi ekstrak tersebut menuju fitofarmaka.

METODE PENELITIAN BAHAN

Bahan utama : herba sambiloto dan kayu manis dari Gunung Pati Semarang, mencit balb/c umur kurang lebih 2 bulan yang di peroleh dari Bandungan Semarang, Levamisol (*Imunostimulator*).

Bahan penyari : Etanol 96%.

Bahan untuk ELISA : Vaksin Hepatitis B (*Engerix B*), PBS, PBST20, serum yang telah diencerkan (1:4 dalam PBS). isotype spesifik IgG dan IgM, Antibodi IgG substrat TMB, 2 N H₂SO₄.

Alat : ependrof tube, mikro plate 96, mikro pipet, blue tip, yellow tip, ELISA Reader

CARA KERJA

Pengumpulan dan Penyerbukan

Sambiloto dan kayu manis diperoleh dari Gunung Pati, Kota Semarang, Jawa Tengah, sambiloto dan kayu manis serbuk dikeringkan di dalam oven. Pengeringan dengan oven pada suhu 40° C sampai kering, kemudian serbuk diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh serta diukur kadar airnya dengan alat *moisture balance* dengan kadar air tidak boleh lebih dari 10%. Serbuk yang telah diayak disimpan dalam wadah kaca tertutup rapat dengan silika gel didalamnya.

menggunakan alat soxhlet. Ekstrak cair yang diperoleh diuapkan dengan tekanan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh konsistensi yang kental. Ekstrak etanol dari kayu manis dan sambiloto yang diperoleh selanjutnya dikumpulkan dan ditimbang masing-masing bobotnya untuk menghitung rendemen yang dihasilkan menggunakan rumus berikut:

$$Rendemen\,Hasil = \frac{Bobot\,Ekstrak\,Etanol}{Bobot\,Bahan} \times 100\% \quad (1)$$

Persiapan Hewan Uji Dan Pengambilan Sampel Uji.

Hewan uji sebanyak 32 (mencit Balb/C yang berumur sekitar 2 bulan dengan berat kira-kira 20 gram) diperoleh dari Bandungan, Semarang Jawa Tengah. Sebelum dilakukan perlakuan hewan uji di adaptasi terlebih dahulu di kandang fakultas Biologi UNNES selama satu minggu. Pada hari ke 8 pengadaptasian hewan uji diambil darahnya lewat vena plexus reortabitalis sebagai data praperlakuan agar kita mengetahui kadar igG dan igM dari hewan uji sebelum diberi perlakuan. Setelah pengambilan darah hewan uji dipuaskan selama 24 jam sebelum menerima perlakuan ekstrak sambiloto dan kayu manis, pada hari selanjutnya (dihitung pada hari 1) hewan uji di beri perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing sampai 28 hari. Pada hari ke 7 hewan uji di induksi vaksin hepatitis B dengan dosis 2,6 µL/20 g BB secara intraperitoneal, kemudian pada hari ke 14 hewan uji diambil darahnya lewat vena plexus retroorbitalis untuk mengetahui kadar IgM pada hewan uji, pada hari ke 21 dilakukan penginduksian hewan uji dengan vaksin hepatitis B dengan dosis 2,6 µL/20 g BB secara intraperitoneal untuk yang kedua kalinya, kemudian paa hari ke 28 (7 hari setelah induksi vaksin ke 2) dilakukan pengambilan darah untuk mengetahui kadar IgG pada hewan uji Penetapan kadar IgG dan IgM dengan metode ELISA Tidak Langsung

Mikroplat 96 dilapisi dengan hepatitis B sebagai antigen kadar 2 µg/mL dalam 18µL PBS per sumuran, diinkubasi semalam pada suhu

Pembuatan Ekstrak

Serbuk kering sambiloto dan kayu manis halus masing-masing diekstrak dengan etanol 96%

4°C. Masing-masing sumuran, cuci 3x dengan 450 μ L 0,05 % PBST20, Ditambahkan 100 μ L serum yang telah diencerkan (1:4 dalam PBS). Diinkubasi 2 jam pada suhu kamar. Cuci 3x dengan 450 μ L 0,05% PBST20. Ditambahkan 100 μ L masing-masing isotype spesifik IgG dan IgM, lalu diinkubasi 30 menit pada suhu kamar. Cuci 3x dengan 450 μ L 0,05% PBST20 dan tambahkan 100 μ L Antibodi IgG 100 μ L masing-masing sumuran yang telah diencerkan (1:5000), diinkubasi 15 menit pada suhu kamar. Cuci 3x dengan 300 μ L 0,05% PBST20. Dimasukkan 100 μ L substrat TMB, lalu inkubasi 15 menit pada suhu kamar. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ l 2 N H₂SO₄. Hasil dibaca dengan mikroplat reader pada panjang gelombang 450 nm.

Analisis Data

Data OD (*Optical Density*) yang menunjukkan jumlah imunoglobulin (IgG dan IgM) dalam serum dengan metode ELISA tak langsung, dihitung purata dan simpangan bakunya, kemudian dianalisis secara statistik. Metode statistik yang digunakan terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Jika data dinyatakan normal dan homogen maka digunakan uji ANOVA dilanjutkan uji LSD, jika hasil yang diperoleh sebaliknya maka digunakan analisis non-parametrik yaitu uji Kruskall Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney dengan taraf kepercayaan 95%.

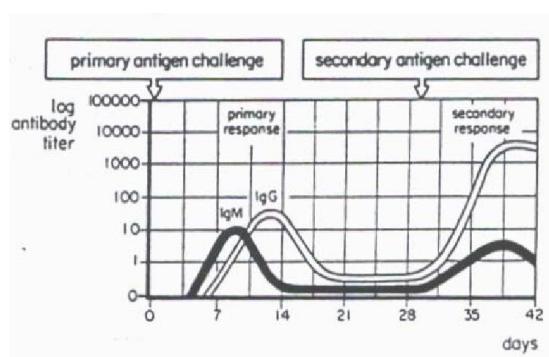
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan aktivitas Immunomodulator kombinasi Ekstrak sambiloto dan kayu Manis berdasarkan pada pengukuran titer Antibodi IgG dan IgM yang terdapat dalam serum Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah Mencit Balb/c jantan yang berumur 2 bulan, dipilih mencit Balb/c karena mencit ini tidak terlalu sensitif terhadap perubahan lingkungan, tetapi dia lebih responsif terhadap perlakuan yang akan diberikan, dipilih jantan karena pada mencit jantan tidak terlalu berpengaruh terhadap hormon reproduksi ,

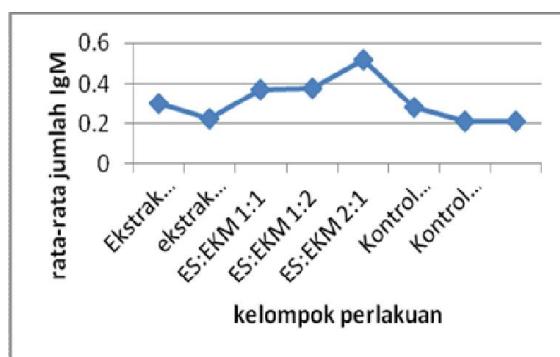
dimana hormon reproduksi tersebut dapat berpengaruh terhadap data yang di dapat.

Pengukuran jumlah IgG dan IgM sebagai penentuan aktivitas immuomodulator menggunakan metode ELISA tidak langsung, pemilihan metode ini karena metode ELISA tak langsung merupakan metode paling sederhana yang dapat digunakan untuk mengukur titer IgG dan IgM. Prinsip dari metode ini adalah dengan mereaksikan antigen dan antibodi yang telah dilabel dengan suatu enzim, kemudian kompleks antigen dan antibodi yang telah di label oleh enzim tersebut dipisahkan dari antigen-antibodi yang bebas lalu diinkubasikan dengan substrat, dimana substrat tersebut akan berwarna apabila dihidrolisis oleh suatu enzim. Intensitas ini lah yang kemudian diukur dengan menggunakan Elisa reader. Semakin pekat intensitas warna yang terbentuk maka antibodi yang dihasilkan semakin banyak.

Vaksin hepatitis B dalam penelitian ini sebagai antigen yang digunakan untuk menginduksi produksi antibodi, penginduksian vaksin dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu pada hari ke 7 dan hari ke 21, kemudian pada hari ke 14 (7 hari setelah pemberian vaksin 1 untuk IgM) dan hari ke 28 (7 hari setelah vaksinasi ke 2, untuk IgG) dilakukan pengambilan sampel darah dari plexus retro orbitalis mencit dengan menggunakan pipa kapiler berheparin. Pengambilan sampel dilakukan berdasarkan kurva produksi antibodi (seehan,1997), seperti pada Gambar 1.

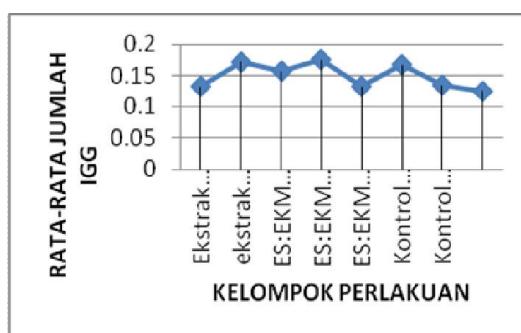


Gambar 1 : Kurva produksi antibodi (seehan, 1997)



Gambar 2: Grafik rata-rata OD penetapan jumlah IgM (serum hari ke 14) dengan metode ELISA tak langsung

Hasil penetapan jumlah IgM dengan menggunakan metode ELISA tidak langsung di sajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 2. Dari grafik dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan ES:EKM 2:1 menunjukkan nilai rata-rata OD paling tinggi. Berdasarkan analisa statistik dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas diperoleh bahwa data normal, tetapi tidak terdistribusi homogen, sehingga digunakan uji kruskall wallis. Pada uji kruskall wallis diperoleh nilai signifikansi 0.045 ($sig < 0.05$) yang artinya terdapat perbedaan antara masing-masing perlakuan. Sehingga dilanjutkan dengan uji mann withney. Pada uji statistik mann withney diperoleh pada perlakuan ES:EKM 2:1 signifikansi ($p<0.05$), dapat meningkatkan jumlah IgM paling besar dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemakain kombinasi ekstrak sambiloto dan kayu manis dengan dosis perbandingan 2 : 1 (300 mg : 150 mg) dapat meningkatkan jumlah IgM paling besar.



Gambar 3 : Grafik rata-rata OD penetapan jumlah IgG (serum hari ke 28) dengan metode ELISA tak langsung

Hasil penetapan jumlah IgG dalam serum mencit menggunakan metode Elisa tak langsung. Grafik diatas menggambarkan jumlah IgG pada hari ke 28, dengan perlakuan ES:EKM dengan perbandingan 1:2 memberikan hasil antibodi paling tinggi dibanding dengan kelompok perlakuan lainnya. Dari grafik 2 dan 3 diatas dapat diketahui bahwa nilai OD jumlah IgG lebih tinggi dibanding dengan nilai OD jumlah IgG, hasil ini tidak sesuai dengan pemaparan pada grafik 1 (seehan,1997) dalam grafik menjelaskan bahwa IgM akan diproduksi paling awal setelah pemaparan antigen, kemudian dalam waktu 3-4 hari kadar IgG jumlahnya lebih tinggi dan akan mencapai puncak pada hari ke 14.

Uji statistik yang digunakan untuk menetapkan jumlah IgG adalah uji ANOVA satu jalan, dari hasil statistik ANOVA di peroleh signifikansi ($p>0.05$) artinya tidak ada perbedaan bermakna pada tiap-tiap kelompok, tetapi kami tetap melanjutkannya dengan menggunakan uji LSD, pada perlakuan kontrol negatif terhadap ES:EKM 1:2 diperoleh nilai signifikansi ($p<0.05$) artinya ada perbedaan bermakna antara perlakuan ES:EKM 1:2 dengan kontrol negatif, sedangkan pada perlakuan lainnya nilai signifikansi yang didapat ($p>0.05$) artinya tidak ada perbedaan bermakna pada perlakuan tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemakain kombinasi ekstrak sambiloto dan kayu manis dengan dosis perbandingan 1:2 (150 mg :300 mg) dapat meningkatkan jumlah IgG paling besar.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan kayu manis dapat meningkatkan sistem imun humorai IgG (pada dosis pemberian 1:2) dan IgM (pada dosis pemberian 2:1). Selain itu pemberian kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan kayu manis dapat meningkatkan sistem imun humorai IgG dan IgM lebih baik dibandingkan dengan pemberian tunggal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim.(2008).Hepatitis, www.liverfoundation.org, diakses tanggal 5 februari 2008
- Depkes RI. (1979). Farmakope Indonesia, Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 151-152, 673.
- Ediati, S.(2007). *The immunomodulatory mechanism extract of Morinda citrifolia L., fruit on hepatocellular carcinoma of mice. International Conference on Traditional Medicine and Medicinal Plants*, Surabaya, 8-9.
- Gunawan, D. dan Mulyani, S. (2004). Ilmu Obat Alam (Farmakognosi), Jilid I, Cetakan I, Penebar Swadaya, Jakarta, 12-13.
- Khusnawati,dkk. (2015). Pengaruh Ekstrak Etanolik 50% Herba Pegagan (Centella Asiatica (L.) Urban) Terhadap Peningkatan Proliferasi Sel Limfosit Mencit Jantan Galur Balb/C Yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, Yogyakarta, Vol. 20(3), p 164-169.
- Kumoro, A.C., Hasan, M. (2007). *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Andrographolide from Andrographis paniculata: Effect of the Solvent Flow Rate, Pressure, and Temperature*, China Journal of Chemical Engineering, Vol 15, 877-883
- Rahayu,M.P. (2014). Aktivitas Fagositosis Makrofag dari Fraksi n-Hekan Sambiloto (Andrographis Paniculata,(Burm.F)Nees) Terhadap mencit yang diinduksi vaksin Hepatitis B,Surakarta,vol 11
- Rahayu,M.P.(2015).Aktivitas mmunomodulator Fraksi n-Hekan Sambiloto (Andrographis niculata,(Burm.F)Nees) Terhadap mencit yang diinduksi vaksin Hepatitis B dengan Parameter IgG, Surakarta,vol 2, hal 35-43
- Ramchandra,N.S.(2006).*unomodulatoryActivity Of Cinnamon Bark*. RajivGandhi University Of Health Sciences.
- Karnataka, Bangalore.
- Seehan C. (1997). *Clinical Immunology, Principle and Laboratory Diagnosis* 2nd Ed, Lippincott, Philadelphia, New York : 26
- Sulaswaty, A. (2002). Proses Ekstraksi dan Pemurnian Bahan Pewangi dari Tanaman Indonesia, Ristek - Data riset, Pusat Penelitian Kimia – LIPI.