

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK UMBI *GYNURA PROCUMBENS (LOUR)*
MERR. TERHADAP PROLIFERASI
LIMFOSIT DI LIEN PADA MENCIT *BALB/C* YANG
DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM***



ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh
Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran

Disusun oleh :

**LINDA IVANA
G2A002103**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006
HALAMAN PENGESAHAN**

Telah diuji pada tanggal 26 Juli 2006 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan,
Artikel Karya Tulis Ilmiah dari :

Nama : Linda Ivana
NIM : G2A 002 103
Fakultas : Kedokteran

Universitas : Universitas Diponegoro, Semarang
Tingkat : Program Pendidikan Sarjana
Bagian : Histologi
Judul : PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK UMBI *GYNURA PROCUMBENS (LOUR) MERR*. DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT LIEN PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*
Dosen Pembimbing : dr. Akhmad Ismail

Semarang, 2 Agustus 2006

Ketua Penguji

Penguji,

dr. A. Zulfa Juniarto, M.Si, Med
NIP. 132 163 896

dr. Ika Pawitra Miranti, M.Kes
NIP. 131 875 465

Mengetahui,
Dosen pembimbing

dr. Akhmad Ismail
NIP. 132 163 894

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK UMBI *GYNURA PROCUMBENS (LOUR) MERR* TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT DI LIEN PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Linda Ivana¹⁾, Akhmad Ismail²⁾

Abstrak

Latar Belakang : *Gynura procumbens (Lour) Merr* telah dikenal sebagai tanaman obat tradisional. Umbi *Gynura procumbens* mengandung senyawa yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit.

Tujuan : Membuktikan pengaruh ekstrak umbi *Gynura procumbens (Lour) Merr* terhadap dalam peningkatan proliferasi limfosit mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metoda : Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan *the post test only control group design* pada hewan coba mencit Balb/C yang terdiri dari 20 ekor mencit jantan, dibagi menjadi 4 kelompok. K merupakan kelompok kontrol yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*, dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) yang diberi ekstrak umbi *Gynura procumbens* dengan dosis bertingkat (0,1mg; 0,2mg; 0,4mg) selama 14 hari yang diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* pada hari ke 9 sebanyak 10^3 . Pada hari ke 15 dilakukan isolasi splenosit dilanjutkan pemeriksaan proliferasi limfosit. Data diperoleh dari perhitungan jumlah limfoblas setiap 200 sel pada area homogen.

Hasil : Didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok K-P1, K-P2 dan K-P3 ($p < 0,05$). Sedangkan pada kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok P1-P2, P1-P3 maupun P2-P3 ($p > 0,05$).

Kesimpulan : Terdapat peningkatan proliferasi limfosit yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak umbi *Gynura procumbens*. Sedangkan pada pemberian ekstrak umbi

Gynura procumbens dengan dosis 0,1mg, 0,2mg dan 0,4mg pada penelitian ini menunjukkan peningkatan proliferasi limfosit yang tidak bermakna

Kata kunci : Proliferasi limfosit, *Gynura procumbens* (Lour) Merr , *Salmonella typhimurium*

- 1) Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- 2) Staf pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

THE EFFECT of GYNURA PROCUMBENS (LOUR) MERR'S TUBER EXTRACT in LYMPHOCYTES PROLIFERATION of BALB/C MICE INFECTED by SALMONELLA TYPHIMURIUM

Linda Ivana¹⁾, Akhmad Ismail²⁾

Abstract

Background : *Gynura procumbens* (Lour) Merr, known as traditional herbal medicine. *Gynura procumbens*'s tuber consists of chemicals that are able to increase lymphocytes proliferation.

Purpose : To prove the effect of *Gynura procumbens* (Lour) Merr's. tuber in lymphocytes proliferation of Balb/C Mice Infected by *Salmonella typhimurium*

Method : An experimental study with the post-test only control group design was carried out on experiment animal Balb/C mice, consisted of 20 male mice which divided into 4 groups. K was control group which only infected by *S. typhimurium* without treatment, and experiment groups (P1,P2,P3) were treated with *Gynura procumbens* (Lour) Merr's root extract with gradual doses (0,1mg; 0,2mg; 0,4mg) for 14 days which infected by 10^3 *Salmonella typhimurium* on the 9th day. On 15th day the spleen of Balb/c mice were isolated and lymphocytes proliferation were counted. We gained the data from the calculation of lymphoblast amount in every 200 cells of homogen lymphocyte area

Results : There were significant differences in lymphoblast count between K-P1, K-P2 and K-P3 ($p < 0,05$). But there were no significant differences in lymphoblast count between P1-P2, P1-P3 and P2-P3 ($p > 0,05$)

Conclusion: There was significant increase of lymphocyte proliferation between the control and the experiment group that was treated by *Gynura procumbens*'s tuber extract. Otherwise, there was no significant increase of lymphocyte proliferation among the experiment group that was treated by *Gynura procumbens*'s tuber extract with gradual doses (0,1mg; 0,2mg; 0,4mg).

Keywords: Lymphocyte proliferation, *Gynura procumbens* (Lour) Merr, *Salmonella typhimurium*

¹⁾ The Undergraduate Student of Medical Faculty of Diponegoro's University

²⁾ Lecturer of Histology Department Medical Faculty of Diponegoro's University

PENDAHULUAN

Demam tifoid adalah penyakit infeksi akut usus halus yang disebabkan oleh infeksi *Salmonella typhi* atau *paratyphi*. Angka kejadian demam tifoid di Indonesia diperkirakan sekitar 300-800 kasus tiap 100.000 penduduk pertahun atau sekitar 600.000-1.500.000 kasus pertahun. Jumlah kematian diperkirakan 50.000 orang pertahun.¹

Salmonella mempunyai hospes yang spesifik. *Salmonella typhi* dan *paratyphi* hanya patogen terhadap manusia, sedangkan *Salmonella typhimurium* patogen terhadap tikus dan memberikan patogenitas yang serupa dengan demam tifoid pada manusia.²

Salmonella merupakan imunogen yang bersifat fakultatif intraseluler.² Karena hidup intraseluler, maka antibodi, komplemen dan sel granulosit tidak dapat mencapai kuman ini. Fagosit mononuklear dan polimorfonuklear yang memegang peranan penting dalam menghambat replikasi bakteri. Sel-sel imunokompeten membunuh mikroba melalui dua cara, yaitu dengan fagositosis bakteri intrasel oleh makrofag yang teraktivasi dan lisis sel yang terinfeksi oleh limfosit T.³ IFN γ dan IL-12 yang diproduksi APC seperti makrofag yang diaktifkan diferensiasi sel CD4 menjadi T helper 1. Sel T helper 1 ini berperan untuk mengerahkan makrofag dan sel inflamasi lain serta meningkatkan aktivasi efek bakterisidal makrofag.⁴

Gynura procumbens (Lour) Merr atau dikenal dengan nama daun dewa merupakan obat tradisional yang telah digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai antikoagulan, antipiretik, anti karsinogen, menghentikan perdarahan, membersihkan racun dan diuretik. Berdasarkan beberapa penelitian terakhir dilaporkan bahwa *Gynura procumbens* mempunyai efek hepatoprotektif, analgetik, anti inflamasi, dan anti viral.^{5,6,7,8} Kandungan kimia dalam *Gynura procumbens* yaitu senyawa flavonoid, saponin, minyak atsiri dan tannin. Penelitian membuktikan bahwa secara laboratoris senyawa *flavonoid* dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit.⁹

Lien merupakan jaringan limfoid terbesar dan berperan penting dalam sistem imun khususnya dalam proliferasi dan diferensiasi limfosit T.¹⁰ Sehingga peningkatan proliferasi limfosit dapat dipakai sebagai indikator peningkatan aktivitas sistem imun melawan infeksi.

Walaupun telah banyak penelitian yang dilakukan terhadap daun tumbuhan *Gynura procumbens* tetapi belum banyak yang mengarah kepada manfaat umbinya, terutama terhadap sistem imun tubuh. Penelitian ini menggunakan dosis bertingkat sehingga dapat mengetahui dosis yang efektif dalam pemakaian ekstrak umbi daun dewa.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan pendekatan *post test only control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian, dimana binatang yang dipakai diambil dengan cara *Randomize Control Trial*. Menggunakan 4 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Penilaian dilakukan hanya pada saat *post test*, dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok perlakuan dan kontrol.

Sampel penelitian diambil secara acak (random) dari populasi terjangkau dengan kriteria inklusi sebagai berikut: mencit BALB/C jantan, umur 8-10 minggu, berat badan 20-25 gram, mencit sehat, dan telah mengalami adaptasi selama 1 minggu. Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan *Research Guidelines For Evaluating The Safety and Efficacy of herbal medicines* dari WHO, yaitu jumlah mencit pada tiap kelompok minimal 5 ekor. Sehingga jumlah total sampel sebanyak 20 ekor.

Mencit Balb/C sebanyak 20 ekor dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Tiap kelompok mencit dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum. Empat kelompok mencit tersebut adalah :

- Kelompok Kontrol (K) : mencit mendapat diet standar selama 14 hari, dan diinfeksi 10^3 kuman/ml *Salmonella typhimurium* pada hari ke-9 secara intra peritoneal
- Kelompok P1 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak umbi *Gynura procumbens* dengan dosis 10 mg peroral perhari selama 14 hari, diinfeksi 10^3 kuman/ml *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-9.
- Kelompok P2 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak umbi *Gynura procumbens* dengan

dosis 20 mg peroral perhari selama 14 hari, diinfeksi 10^3 kuman/ml *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-9.

Kelompok P3 : mencit mendapat diet standar dan ekstrak umbi *Gynura procumbens* dengan dosis 40 mg peroral perhari selama 14 hari, diinfeksi 10^3 kuman/ml *Salmonella typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-9.

Hari ke-15 mencit dibunuh dengan cara dekapitasi tulang belakang pada leher. Selanjutnya dilakukan pembedahan dan pengambilan lien untuk pembuatan preparat dan pemeriksaan terhadap proliferasi limfosit di lien. Pemeriksaan limfosit dilakukan dengan menghitung jumlah limfoblas dalam 200 sel pada area homogen limfosit lien dari kelompok perlakuan dibanding dengan kelompok kontrol.

Analisa statistik yang digunakan adalah statistik non parametrik, yaitu uji *Kruskal Wallis* dan uji *Mann Whitney U*. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p \leq 0,05$.

HASIL

Hasil penghitungan jumlah limfoblas dalam 200 sel pada area homogen limfosit lien semua kelompok ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel.1 Jumlah limfoblas semua kelompok mencit

Kelompok	Jumlah limfoblas mencit ke-					Mean \pm SD
	1	2	3	4	5	
K	13	16	19	9	20	15,4 \pm 4,5
P1	22	20	26	22	24	22,8 \pm 2,3
P2	21	29	17	28	33	25,6 \pm 6,5
P3	21	33	32	28	29	28,6 \pm 4,7

Gambar 1. *Box-plot* rerata jumlah limfoblas

Dari tabel dan grafik *box-plot* diatas, rata-rata jumlah limfoblas pada kelompok P lebih besar dibandingkan dengan kelompok K, Dengan rerata jumlah limfoblas tertinggi pada kelompok P3.

Hasil uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbandingan lebih dari dua independen sampel ternyata didapatkan $p=0,011$ ($p<0,05$) berarti terdapat perbedaan yang bermakna. Selanjutnya dilakukan uji *Mann Whitney* untuk membandingkan tiap 2 independen sampel, dengan hasil sebagai berikut :

Tabel. 2 Nilai p dari uji statistik *Mann Whitney U* jumlah limfoblas

	K	P1	P2
P1	0,012*		
P2	0,028*	0,463	
P3	0,009*	0,075	0,459

* Bermakna

Pada uji *Mann Whitney U* (Tabel 2) dapat dilihat bahwa jumlah limfoblas pada kelompok K dibanding dengan kelompok P1 terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,012$), kelompok K dibanding dengan kelompok P2 ($p=0,028$), dan kelompok K dibanding dengan kelompok P3 ($p=0,009$). Sedangkan pada perbandingan antara kelompok P1 dengan kelompok P2 tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,463$), antara kelompok P1 dengan kelompok P3 ($p=0,075$), begitu juga antara kelompok P2 dengan kelompok P3 ($p=0,459$).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada mencit kelompok perlakuan yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura procumbens* dibanding dengan kelompok kontrol yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* tanpa pemberian *Gynura procumbens* mempunyai kecenderungan peningkatan jumlah limfoblas yang bermakna pada lien mencit yaitu kelompok K dibanding dengan kelompok P1 yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura procumbens* sebanyak 0,1 mg/hari selama 14 hari ($p=0,012$), kelompok K dibanding dengan kelompok P2 yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura procumbens* sebanyak 0,2 mg/hari selama 14 hari ($p=0,028$), dan perbandingan dengan nilai kepercayaan tertinggi yaitu kelompok K dibanding dengan kelompok P3 yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura procumbens* sebanyak 0,4 mg/hari selama 14 hari ($p=0,009$).

Jumlah relatif limfoblas yang tinggi diasumsikan jumlah limfosit juga akan tinggi. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak umbi *Gynura procumbens* berpengaruh pada sistem imun seluler karena mampu meningkatkan proliferasi limfosit.

Antar kelompok perlakuan tidak didapatkan peningkatan jumlah limfoblas yang bermakna. Hal ini disebabkan karena dosis yang digunakan antar kelompok perlakuan (0,1 mg, 0,2 mg dan 0,4 mg) jika dikonversikan kedalam dosis untuk manusia masih dalam rentang dosis terapi untuk manusia manusia menurut Prof. Hembing Wijayakusumah yaitu sebesar 6-9 gr/hari.¹¹

Respon imun protektif terhadap infeksi *Salmonella typhimurium* adalah imunitas seluler (*cell mediated immunity*). Reaksi yang terjadi dalam respon imun tersebut adalah:

1. Penghancuran bakteri yang difagosit oleh makrofag yang diaktivasi oleh sitokin – sitokin yang diproduksi limfosit T dan
2. Lisis terhadap sel yang terinfeksi oleh sel T CD8⁺ (CTLs) dan sel NK.

Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ merespon antigen dari mikroba yang difagosit yang berkaitan dengan molekul *Major*

Histocompatibility Complex (MHC) kelas II ke permukaan sel yang akan dikenali oleh limfosit T. Interaksi ini menyebabkan limfosit mensekresi IL – 12 yang akan memacu proliferasi dan diferensiasi limfosit menjadi T CD4⁺. Sel ini akan mensekresi IL – 2 yang akan membantu proliferasi dan diferensiasi sel T menjadi sel T CD8⁺ dan mensekresi IFN- γ yang memacu aktivitas makrofag dalam mengeliminir bakteri.^{3,4}

Senyawa aktif flavonoid yang terkandung dalam *Gynura procumbens* memiliki khasiat sebagai antiseptik, antikanker dan antioksidan.⁷ Menurut penelitian Jiao *et al*, disebutkan bahwa senyawa *flavonoid* meningkatkan aktivitas IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit.⁹

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian ekstrak umbi *Gynura procumbens (Lour) Merr* pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* berpengaruh dalam hal meningkatkan respon proliferasi limfosit.
2. Didapatkan rerata jumlah limfoblas tertinggi pada pemberian ekstrak umbi *Gynura procumbens (Lour) Merr* dengan dosis 0,4 mg per oral per hari
3. Tidak didapat peningkatan proliferasi limfosit yang bermakna antar pemberian dosis bertingkat yaitu sebesar 0,1 mg, 0,2 mg dan 0,4 mg per oral perhari.

SARAN

1. Perlu dilaksanakan penelitian lebih lanjut mengenai pemberian *procumbens (Lour) Merr*. Dosis bertingkat dengan penentuan dosis menggunakan log10.
2. Perlu dilakukan uji toksisitas dan penentuan LD 50 *Gynura procumbens (Lour) Merr*. terhadap hewan coba sehingga diketahui batas keamanan dari dosis *Gynura procumbens (Lour) Merr*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih setulus-tulusnya kepada dr. Akhmad Ismail atas bimbingannya

sehingga penulis dapat menyelesaikan artikel ini, dr. Ika Pawitra Miranti, M.Kes selaku penguji, dr Ahmad Zulfa Juniarto, M.Si, Med selaku ketua penguji, dr. Neni Susilaningsih, M.Si selaku dosen wali, staf Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP, staf laboratorium Parasitologi UNDIP, staf bagian Histologi serta semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian. Kepada keluarga dan teman-teman yang telah memberikan dorongan moral dan material hingga selesai pembuatan Artikel Karya Tulis Ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Isbandrio B. Salmonella. Dalam buku : Belajar Bertolak Dari Masalah Demam Tifoid. Semarang : Badan Penerbit Universitas Diponegoro, 2001. 35-8
2. Jawetz, Melnick, Adelberg, dkk. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 20. Cetakan I. Jakarta : EGC, 1996. 244-5
3. Abbas AK, Lichtman AH, et al. Cellular and molecular Immunology. 2nd edition. Philadelphia : Saunders Co, 1994. 323 – 6
4. Karnen GB. Immunologi dasar ed 2, Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1991
5. Winarto WP., Tim Karyasari. Daun Dewa: Budi Daya dan Pemanfaatan untuk obat. Cetakan I. Jakarta : Penebar Swadaya, 2003. 2-9
6. Anonymous. flavonoids. Available from : http://www.phytotherapies.org/constituens_cfm?id=61. Accessed April 21, 2005
7. Maryati H, Suharmiati. Khasiat dan manfaat daun dewa dan sambung nyawa, cetakan 1, Jakarta : Agromedia Sehat, 2003. 1-5
8. Anonymous. Khasiat Tanaman Obat Daun Dewa. Available from : http://www.iptek.net.id/ind/cakra_obat/tanamanobat.php?id=34. Accessed April 18, 2005
9. Jiao Y, Wen J, Yu X. Influence of flavonoid of astragalus membranaceus's stem and leaves on the function of cell mediated immunity in mice. Heilongjiang University (serial on line). Available from : URL: HIPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Accessed April 21, 2005

10. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Histologi dasar. Edisi 8. Jakarta : EGC, 1997. 270-6
11. Wijayakusuma, H. Atasi kanker dengan tanaman obat. Cetakan 1. Jakarta, Puspa Sehat, 2004. pp 29-30.

LAMPIRAN 1:

CARA PEMBUATAN EKSTRAK UMBI *GYNURA PROCUMBENS (LOUR) MERR.* (dilakukan dilaboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Diponegoro)

1. Bahan umbi *Gynura procumbens (Lour) Merr.* yang telah dikeringkan dan ditumbuk halus (\pm 1 kg)

- dimasukkan dalam alat soklet sedikit demi sedikit sesuai dengan kapasitas alat (50 gr). Kemudian dilakukan ekstraksi dengan pelarut ethanol hingga larutan menjadi bening (tiap sampel dilakukan 8-10 kali sirkulasi).
2. Larutan ekstrak umbi *Gynura procumbens (Lour) Merr.* yang sudah jadi dipindahkan kedalam labu *rotary evaporator* dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat dengan suhu 40°C.
 3. Larutan yang sudah pekat tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 1 jam untuk menghilangkan alkoholnya.
 4. Setelah kering didapatkan crude total ekstrak sebanyak 1% dari 1 kg umbi *Gynura procumbens (Lour) Merr.* yaitu kurang lebih 10 gram ekstrak umbi *Gynura procumbens (Lour) Merr.*

LAMPIRAN 2:

DOSIS KONVERSI EKSTRAK UMBI DAUN DEWA

- Konversi dosis pada manusia yang berat badannya 70 kg ke mencit yang berat badannya 20 gram adalah 0,0026 (Laurence & Bacharach; 1964)
- Besarnya dosis umbi *Gynura procumbens* ditentukan berdasarkan dosis yang dianjurkan pada manusia adalah 6-9 gram/hari.

Penghitungan:

- Dosis umbi *Gynura procumbens* pada manusia 6-9 gram
- Faktor konversi = 0,0026
- Dosis ekstrak umbi *Gynura procumbens* untuk mencit 20 gr adalah
$$= 0,0026 \times 6000\text{mg}$$
$$= 15,6 \text{ mg} \sim 15 \text{ mg} / 20 \text{ gram BB}$$

Umbi *Gynura procumbens (Lour.) Merr.* disiapkan dalam 3 besaran dosis kelipatan 2 untuk tiap kelompok, yaitu 0,1 mg; 0,2 mg; 0,4 mg.

Hasil ekstrak 1 Kg umbi *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. sebesar 10 gram maka:

$$\text{Prosentase} = \frac{10}{1000} \times 100 \% = 1 \%$$

Jadi pemberian dosis ekstrak umbi *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. adalah :

$$\begin{aligned} \text{Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi dosis} &= 10 \text{ mg} \times 1 \% \\ &= 0,1 \text{ mg} / 20\text{grBB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi dosis} &= 20 \text{ mg} \times 1 \% \\ &= 0,2 \text{ mg} / 20\text{grBB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi dosis} &= 40 \text{ mg} \times 1 \% \\ &= 0,4 \text{ mg} / 20\text{grBB} \end{aligned}$$

LAMPIRAN 3:

PENGECERAN DAN CARA PEMBERIAN EKSTRAK UMBI DAUN DEWA

- Untuk mempermudah pemberian ekstrak peroral dilakukan pengenceran terhadap *crude extract* ekstrak umbi *Gynura procumbens*.
- Kapasitas maksimal lambung mencit adalah ± 1 ml, karena itu volume pemberian ekstrak tidak boleh melebihi 1 ml.
- Pada penelitian mencit diberikan ekstrak per oral melalui sonde lambung dengan volume 0,25 ml.
- Pengenceran:

Pelarut yang digunakan adalah aquadest.

- Kelompok P1 (dosis per hari 0,1mg)
Dalam 0,25 ml terdapat 0,1 mg ekstrak.
40 mg ekstrak dilarutkan dalam 100 ml aquadest
- Kelompok P2 (dosis per hari 0,2 mg)
Dalam 0,25 ml terdapat 0,2 mg ekstrak.
80 mg ekstrak dilarutkan dalam 100 ml aquadest
- Kelompok P3 (dosis per hari 0,4 mg)
Dalam 0,25 ml terdapat 0,4 mg ekstrak.
160 mg ekstrak dilarutkan dalam 100 ml aquadest

Cara pengenceran:

1. Ekstrak ditimbang dengan menggunakan alat penimbang digital sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan. 40 mg untuk kelompok P1, 80 mg untuk kelompok P2 dan 160 mg untuk kelompok P3.

2. Memasukkan aquadest kedalam gelas ukur hingga mencapai angka 100 ml untuk masing-masing kelompok.
3. Aquadest dengan ekstrak dicampur hingga homogen.

LAMPIRAN 4:

PROSEDUR ISOLASI SPLENOSIT MENCIT

Metode Mishell (1980) dan Ding (1984)

Alat:

1. Pemanas alkohol
2. Beaker glass volume 50-70 ml
3. Gunting
4. Pinset
5. Petri dishes
6. Refrigerated sentrifuge
7. Pipet Pasteur
8. Laminar flow hood

Bahan:

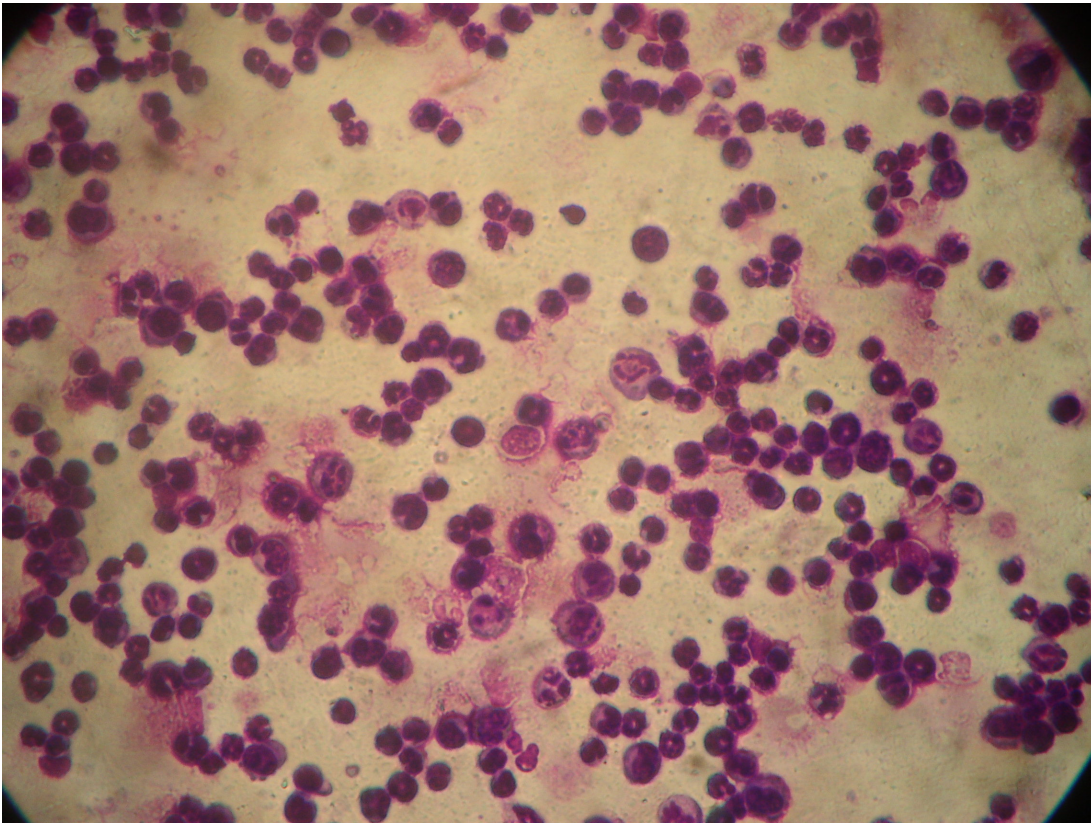
1. Eter
2. PBS (Phosphat Buffer Saline)

Prosedur:

1. Rendam gunting dan pinset dalam ethanol 95%. Gunting peritoneum dengan irisan berbentuk huruf U mengelilingi limpa. Peritoneum diangkat keatas, angkat limpa dengan menggunakan pinset. Pisahkan limpa dari pembuluh darah dan jaringan sekitarnya dengan menggunakan gunting. Letakkan limpa pada Petri dish berisi 1,5 ml PBS.
2. Hancurkan limpa dengan menggunakan pinset.
3. dengan menggunakan pipet Pasteur, pindahkan suspensi sel kedalam tabung pemusing. Biarkan sel-sel yang menggumpal mengendap selama 5 atau 6 menit.
4. pindahkan suspensi sel ke tabung yang lain dan pusingkan sel pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Pindahkan pellet yang didapat lalu diresuspensikan dalam 2 ml lysing buffer pada suhu ruang (± 25 °C) untuk melisiskan eritrosit, lalu pusingkan pada kecepatan 2000 rpm selama 10 mnt pada suhu 4 °C.

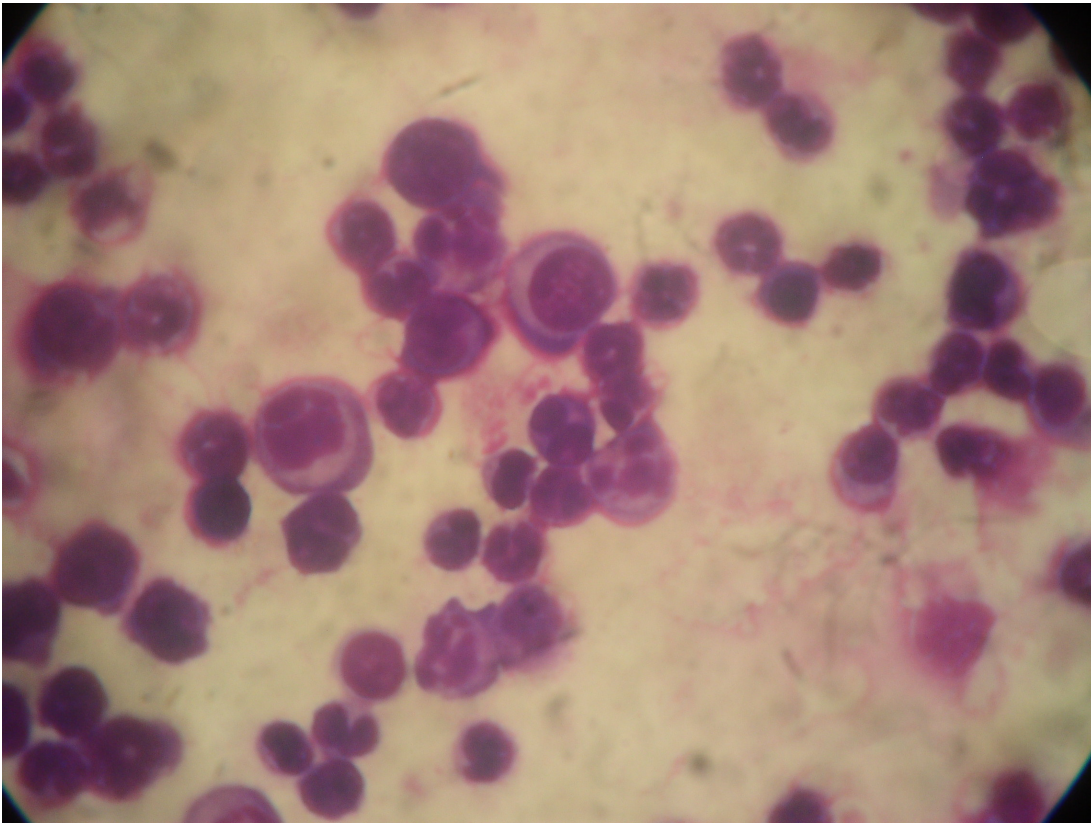
5. Buang supernatan dan pellet dicuci 2x dengan PBS dengan cara dipipet berulang-ulang dan dipusingkan pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C.
6. Hitung sel-sel dengan menggunakan hemasitometer dengan kepadatan 3×10^7 sel/ml.

LAMPIRAN 5



Gambar 1. preparat lien hapus perbesaran 45x obyektif.

Ket: Panah merah menunjukkan limfoblas dan panah kuning menunjukkan limfosit



Gambar 2. preparat lien hapus perbesaran 100x obyektif.

Ket: Panah merah menunjukkan limfoblas dan panah kuning menunjukkan limfosit