Jurnal Pharmascience, Vol 2, No. 1, Februari 2015, hal: 35 – 43
ISSN : 2355 – 5386
Research Article

Aktivitas Imunomodulator Fraksi n-Heksan dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata*, (Burm.F) Nees) Terhadap Mencit yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B dengan Parameter Ig G

Mamik Ponco Rahayu
Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta
Email: pi_er@yahoo.co.id

Abstrak

Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Burm. Nees) mengandung banyak komponen senyawa kimia yang telah banyak di teliti dengan aktivitas sebagai hepatoprotektor dan salah satu kandungan zat aktifnya yaitu andrographolid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari A. paniculata yang mempunyai aktivitas sebagai imunomodulator dan hepatoprotektor terhadap mencit Balb/c yang telah diinduksi vaksin hepatitis B. Ekstraksi herba sambiloto menggunakan alat Soxhlet dengan pelarut yang berseri. Vaksin hepatitis B digunakan sebagai penginduksi mencit Balb/c. Sebagai tolok ukur imunostimulator adalah peningkatan jumlah antibodi IgG dengan ELISA tidak langsung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan (2,7 mg/20 g BB mencit) menunjukkan peningkatan IgG tertinggi. Tiga fraksi teraktif dengan peningkatan jumlah IgG tertinggi sampai terendah yaitu F2 (0,569 mg/20 g BB mencit), F1(0,126 mg/20 g BB mencit), F4(0,094 mg/20 g BB mencit).

Kata Kunci : Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Burm. Nees), Imunomodulator, Hepatoprotektor, Vaksin Hepatitis B

Abstract

Andrographis herbs (Andrographis paniculata Burm. Nees) has many active compounds , which shown hepatoprotector activity and one of its component is andrograpolide. Therefore, the aim of this study were to search the active compounds from A. paniculata as imunomodulator from the BALB/c mice was induced by hepatitis B vaccine. Andrographis herbs was extracted using Soxhlet by series of solvents. The isolation process was guided with in vivo imunommodulatory assay induced by hepatitis B vaccine in Balb/c mice. The imunostimulant activity was assesed through the increasing of IgG antibody. Hexane extract (2.7 mg /20 g mice) was increasing the titer of IgG higher than others. The fractions activity on increasing IgG titer from highest to lowest were F2 (0.569 mg/20 g mice), F1(0.126 mg/20 g mice), F4(0.094 mg/20 g mice).

Keywords : Andrographis herbs (Andrographis paniculata Burm. Nees), Immunomodulator, Hepatoprotektor, hepatitis B vaccine

I. PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara yang mempunyai carrier hepatitis B terbanyak nomor tiga setelah Cina dan India. Menurut WHO, Indonesia termasuk daerah hepatitis B yang endemis dengan tingkat penderita sedang dan berat. Penderita hepatitis B sebagian besar akan sembuh dengan baik dan hanya sebagian kecil saja yang langsung meninggal oleh ganasnya virus atau karena ketahanan tubuh yang rendah. Pengobatan hepatitis B dapat melalui immunomodulator meliputi semua bahan yang memacu respon imun untuk menghancurkan sel hati yang terinfeksi dengan virus hepatitis B dan membersihkan hati dari virus (Anonim, 2006).

Menurut pandangan sistem pengobatan tradisional obat-obat alam termasuk obat-obat nabati, dapat mèmpengaruhi mekanisme pertahanan alamiah tubuh. Seiring dengan makin berkembangnya pemahaman mengenai respon imun tubuh dalam menghadapi infeksi maupun penyakit lain, makin berkembang pula penelitian mengenai komponen yang dapat mempengaruhi respon imun tersebut. Ada beberapa obat tradisional yang memiliki aktivitas tersebut, salah satunya adalah tanaman sambiloto (Andrographis paniculata Ness) dengan kandungan aktifnya andrografolid. Berdasarkan penelitian Xu Y *et al*., (2007) bahwa ekstrak sambiloto dapat meningkatkan produksi IFN-γ dari mencit yang divaksinasi dengan Salmonella typhimurium.

Widyawaruyanti *et al*., (1995) melaporkan bahwa ekstrak non polar dan semi polar dari herba sambiloto dapat menghambat pertumbuhan Plasmodium falciparum secara in vitro dengan sifat imunostimulan terhadap sekresi IFN-γ dan imunosupressan terhadap sekresi TNF-ά. Senyawa murni andrografolid mempunyai aktivitas imunostimulan yang lebih rendah daripada ekstrak sambiloto, dimungkinkan ada senyawa- senyawa lain yang secara sinergis meningkatkan respon imun mencit terhadap antigen sel darah merah domba (Puri ,*et al*., 1993). Oleh karena itu dilakukan fraksinasi ekstrak sambiloto menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya sehingga dapat diketahui senyawa-senyawa aktif yang mempunyai aktifitas sebagai imunomodulator.

Vaksin hepatitis B sebagai antigen dapat menginduksi produksi antibodi anti-HBs yang memberikan imunitas terhadap hepatitis B. Produksi anti-HBs dapat ditingkatkan atau diturunkan oleh senyawa aktif yang terdapat dalam bahan alam. Dalam penelitian ini digunakan vaksin hepatitis B yang mengandung 5 µg/0,5 mL HbsAg karena lebih aman dibanding dengan virus hepatitis yang aktif. Antibodi anti-HBs yang diukur jumlahnya adalah IgG, tingginya jumlah IgG menunjukkan adanya respon kronis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak sambiloto mempunyai potensi sebagai imunomodulator dan terhadap regenerasi sel hati pada mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B.

II. METODE PENELITIAN

A. Bahan

Bahan utama : herba sambiloto diperoleh dari daerah Matesih, Karanganyar dan mencit Balb/c (umur kurang lebih 3 bulan, dengan berat badan kurang lebih 20 g diperoleh di Laboratorium Farmakologi, Fakuktas Farmasi UGM, Imboost® (imunostimulator). Bahan penyari : n-heksan, etil asetat, metanol. Bahan KLT : fase diam (Silika gel GF254); fase gerak (Toluen, n-heksan, etil asetat, metanol,kloroform)

Bahan untuk ELISA : kalium klorida, natrium klorida, natrium fosfat, tween 20, asam sitrat, asam sulfat, hidrogen peroksida 30%, ortho-peroksida (OPD)(Sigma), asam sulfat, peroksida conjugate antimouse (Sigma), vaksin hepatitis (Engerix B), kloroform, aquadest, tween 80, Buffer posphat(Na_2HPO_4 dan KH_2PO_4). Alat: Ependroff Tube, tip biru, tip kuning, alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium.

B. Cara Kerja

1. Pengumpulan dan Penyerbukan

Herba sambiloto diambil secara keseluruhan mulai dari bagian atas tanah sampai bunganya. Bagian untuk daun yang diambil berwarna hijau gelap, bebas dari penyakit ditandai dengan tidak adanya bercak-bercak hitam atau lubang. Pengambilan herba dilakukan pada sore hari. Bahan yang akan dikeringkan dicuci bersih setelah itu dipotong-potong kemudian herba dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Bahan yang sudah kering segera diserbuk dengan mesin penyerbuk, serbuk yang didapat diayak dengan ayakan no.40.

2. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak sambiloto diperoleh dengan penyarian bertingkat menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya dari n-heksan, etil asetat dan metanol secara sokhlet.

3. Fraksinasi ekstrak sambiloto

Pemisahan senyawa-senyawa aktif dari ekstrak sambilloto dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom vakum (KKV). Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF_{254} dan sebagai fase geraknya pelarut organik dan campurannya dengan polaritas yang semakin meningkat. Prosedur pelaksanaan KLT dan KKV disesuaikan menurut Richard., (1998) dan Sarker., *et al*, (2006). Fase diam yang digunakan untuk fraksinasi adalah silika gel F254 tanpa gypsum seberat 40 g dimasukkan ke dalam kolom (20 cm x 5 cm) kemudian diatasnya ditaburkan ekstrak dalam bentuk serbuk. Elusi dilakukan secara gradien dimulai dari pelarut nonpolar sampai polar sehingga diharapkan senyawa dapat terpisah secara berurutan mulai dari yang nonpolar sampai polar. Eluen yang digunakan yaitu n-heksan; n-heksan - etil asetat (9:1); n-heksan - etil asetat (8:2); n-heksan - etil asetat (7:3); n-heksan - etil asetat (6:4); n-heksan - etil asetat (5:5); n-heksan - etil asetat (4:6); etil asetat, etil asetat - metanol (9:1); etil asetat -metanol (8:2); etil

asetat - metanol (7:3); etil asetat -metanol (6:4); etil asetat -metanol (5:5).

4. Persiapan hewan uji dan pengambilan sampel uji

Sejumlah 30 ekor mencit sehat umur ±12 minggu berat ± 20 g dibagi menjadi 3 kelompok @ 5 ekor yaitu Kelompok I sebagai kelompok ekstrak yang dibagi menjadi 3 grup @5 ekor (ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat ,ekstrak metanol); Kelompok II @5 ekor sebagai kontrol positif imunostimulator (Imboost®), hepatoprotektor (Curcuma plus®) dan Kelompok III @5 ekor sebagai kontrol negatif (CMC 1%). Kelompok hewan uji diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum diberi vaksin Hepatitis B, untuk kelompok hewan uji ekstrak dengan pemberian peroral dengan dosis 2,7 mg/20 g BB mencit Balb/c sekali sehari masing-masing kelompok ekstrak n-heksana (EH), ekstrak etil asetat (EEA), ekstrak metanol (EM) dengan konsentrasi 0,5 %. Setelah dikondisikan pada semua kelompok dilakukan vaksinasi I (dihitung sebagai hari ke 0 setelah 7 hari pengkondisian) dengan diberi vaksin Hepatitis B yang dilakukan secara intraperitoneal. Vaksinasi kedua dilakukan pada hari ke 28, selama pemberian vaksin tetap diberi perlakuan yang sama pada masing-masing kelompok. Pada hari ke 32 yaitu 4 hari setelah vaksin kedua dilakukan pengambilan darah dari plexus retroorbitalis dengan pipa kapiler berheparin untuk penetapan jumlah IgG. Penetapan jumlah IgG dengan metode ELISA tak langsung.

5. Penetapan kadar IgG dengan metode ELISA

Microplate dilapisi dengan antigen 5 μg/ml dalam PBS sebanyak 100 μl untuk setiap sumuran lalu diinkubasi semalam pada suhu 4^{o}C. Setelah dicuci dengan PBST 0,05 % sebanyak 4x 200 μl setiap sumuran, lempeng diblok dengan BSA 0,5 % dalam PBS dan diinkubasi selama 1 jam di *waterbath* 37^{o}C. Lempeng dicuci 4x dengan PBST 0,05 % kemudian diisi serum dengan pengenceran 1:100 dalam PBS sebanyak 100 μl setiap sumuran. Setelah diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, lempeng dicuci 4x dengan PBST 0,05 %. Sebanyak 100 μl isotipe spesifik untuk masing-masing imunoglobulin, dimasukkan ke masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Lempeng dicuci 4x dengan PBST 0,05 %, lalu konjugat peroksidase dimasukkan ke setiap sumuran sebanyak 100 μl. Setelah inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar, lempeng dicuci 4x dengan PBST 0,05 %. Substrat OPD ditambahkan ke masing–masing sumuran sebanyak 100 μl dan diinkubasi 15 menit di tempat gelap pada suhu kamar. Reaksi dihentikan dengan H_2SO_4 2,5 M sebanyak 50 μl untuk setiap sumuran. OD dibaca dengan ELISA reader pada λ 490 nm.

6. Analisis data

Data yang diperoleh dievaluasi secara statistik yang melibatkan semua kelompok perlakuan. Metode statistic 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%.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Herba Sambiloto

Ekstraksi serbuk herba Sambiloto dilakukan secara bertingkat dengan metode Soxhlet menggunakan pelarut yang berbeda polaritasnya yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol. Ekstraksi dengan pelarut n-heksan dilakukan untuk menyari senyawa-senyawa yang bersifat non polar, pelarut etilasetat untuk menyari senyawa yang bersifat semipolar dan ekstraksi dengan metanol dimaksudkan untuk menyari senyawa-senyawa yang bersifat polar. Berat ekstrak n-heksan yang diperoleh dari 550 g serbuk herba sambiloto adalah 4,53 g, dari hasil tersebut dapat dihitung rendemen ekstrak terhadap berat serbuk sebesar 0,83 %. Ekstrak berwarna hijau kekuningan dengan aroma dan rasa yang sangat pahit. Ekstrak yang diperoleh dengan pelarut etil asetat berwarna hijau tua, aroma menusuk tajam dan rasa yang pahit. Berat ekstrak etil asetat dari 300 g serbuk herba sambiloto adalah 25,89 g dengan rendemen ekstrak terhadap berat serbuk sebesar 8,63 %. Ekstrak metanol yang diperoleh berwarna coklat dengan aroma dan rasa yang tidak pahit dengan rendemen ekstrak terhadap serbuk diperoleh 9,61 %.

B. Penentuan Aktivitas Imunomodulatar Herba Sambiloto

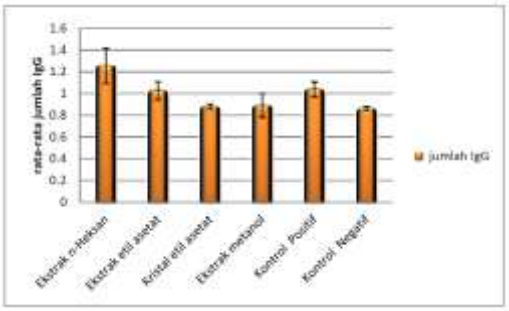
Aktivitas imunomodulator dari ekstrak herba sambiloto ditentukan dengan Bioassay guided isolation menggunakan metode *in vivo bioassay*. Tahapan ekstraksi secara bertingkat dari pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol dilakukan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator yang paling kuat.

Penentuan aktivitas imunostimulator berdasarkan pengukuran jumlah IgG dengan metode ELISA tak langsung. Pemilihan metode ini karena merupakan konfigurasi paling sederhana yang dapat digunakan untuk mengukur titer IgG. Prinsip dari metode ini adalah mereaksikan antigen dengan antibodi yang dilabel enzim sehingga terbentuk kompleks antigen-antibodi. Kompleks antigen-antibodi yang dilabel enzim dipisahkan dari antigen dan antibodi yang bebas lalu diinkubasikan dengan suatu substrat. Substrat kromogenik yang semula tidak berwarna kemudian menjadi berwarna apabila dihidrolisis oleh enzim. Intensitas warna yang terjadi diukur dengan spektrofotometer dan hasilnya dinyatakan dalam optical density yang menunjukkan nilai titer antibodi IgG. Semakin tinggi intensitas warna maka antibodi yang dihasilkan semakin banyak.

Dalam penelitian ini, vaksin hepatitis B digunakan sebagai antigen untuk menginduksi produksi antibodi anti-Hbs karena lebih aman dibanding dengan virus hepatitis B yang aktif. IgG dalam serum diinkubasi pada suhu 4°C sehingga pengikatan dengan antigen yang terikat pada

substrat padat akan terjadi. Antigen yang terikat dapat terlepas pada konsentrasi tinggi dan akan menghambat pengikatan antibodi pada antigen yang terikat substrat karena terjadi kompetisi antara antigen terikat substrat padat dengan antigen yang terlepas untuk berikatan dengan antibodi. Untuk mengurangi reaksi pengikatan non spesifik pada antigen ini maka dilakukan pencucian dengan larutan yang mengandung PBST 20. Reaksi pengikatan non-spesifik harus dihambat dengan cara pemblokan substrat padat dengan BSA.

Horseradish peroxidase merupakan enzim yang digunakan untuk melabel antibodi sehingga dapat diketahui adanya antibodi IgG yang terikat. Pengukuran titer antibodi pada hari ke-0 tidak dilakukan karena diasumsikan sama pada semua kelompok perlakuan. Dari hasil pengukuran titer antibodi IgG pada hari ke-32 (4 hari setelah Imunisasi II), kelompok perlakuan ekstrak n-heksan herba sambiloto dosis 2,7 mg/20 g BB mencit mempunyai nilai optical densiti yang lebih tinggi dibandingkan kelompok ekstrak etil asetat dan metanol.

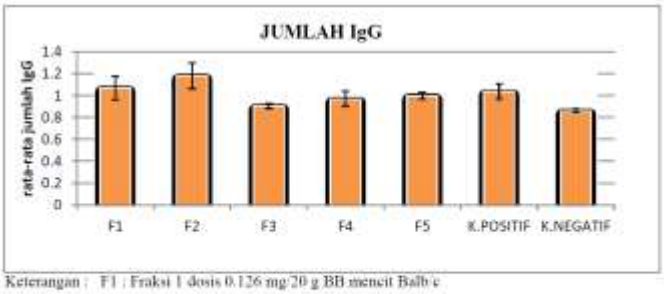


Gambar 1. Rata-rata jumlah IgG dari kelompok ekstrak dosis 2,7 mg/BB mencit, kontrol positif Imboost® dosis 0.56 mg/BB mencit dan kontrol negatif.

Dari gambar histogram di atas terlihat bahwa rata-rata jumlah IgG tertinggi dimiliki oleh ekstrak n-heksan (1,257± 0,16), kemudian di ikuti oleh kontrol positif (1,038 ±0,098), ekstrak etil asetat (1,025 ± 0,08), ekstrak methanol (0,890 ±0,11), Kristal etil asetat (0,878 ±0,03) dan terendah kontrol negatif (0,861±0,01) . Gambar histogram terendah dimiliki oleh kontrol negatif dan kristal dari etil asetat. Berdasarkan analisa satistik secara ANOVA diperoleh ada perbedaan yang signifikan, kemudian untuk melihat perbedaan antar kelompok dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji LSD diperoleh bahwa ekstrak n-heksan mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap semua kelompok perlakuan. Ekstrak etil asetat meskipun mempunyai pengaruh terhadap produksi antibodi yang tinggi dibanding ekstrak metanol tapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok yang lain.

Uji aktivitas imunostimulator lanjutan dilakukan pada 5 fraksi dari ekstrak n-heksan dengan pemberian dosis pada masing-masing fraksi berbeda karena diperhitungkan berdasarkan rendemen yang dihasilkan dari proses fraksinasi terhadap dosis awal pemberian ekstrak. Semakin banyak ekstrak yang terfraksinasi, maka pemberian dosis juga akan semakin besar, sehingga dari sini dapat diketahui juga komponen yang dapat memberikan aktivitas Produk antibodi hasil pemberian vaksin hepatitis B sebanyak 2 kali, yaitu berturut-turut pada hari ke-0 dan ke-28 ditetapkan jumlahnya dengan metode ELISA tidak langsung. Pengambilan sampel darah dari plexus retro

orbitalis mencit dengan pipa kapiler berheparin pada hari ke-32 (4 hari setelah pemberian vaksin II).



Keterangan : F1 : Fraksi 1 dosis 0.126 mg/20 g BB mencit Balb/c
F2 : Fraksi 2 dosis 0.569 mg/20 g BB mencit Balb/c
F3 : Fraksi 3 dosis 1.446mg/20 g BB mencit Balb/c
F4 : Fraksi 4 dosis 0.094 mg/20 g BB mencit Balb/c
F5 : Fraksi 5 dosis 0.220 mg/20 g BB mencit Balb/c
Kontrol positif : Imboost® dosis 0.65 mg/20 g BB mencit Balb/c

Gambar 2. Rata-rata jumlah IgG dengan metode ELISA tidak langsung pada mencit Balb/c yang di induksi vaksin hepatitis B.

Pada gambar histogram diatas menunjukkan bahwa jumlah IgG kelima fraksi berturut-turut sebagai berikut : fraksi 1(1,068 ± 0,107), fraksi 2 (1,180 ± 0,064), fraksi 3 (0,903 ± 0,023), fraksi 4 (0,968 ± 0,070) dan fraksi 5 (0,997 ± 0,033). Berdasarkan uji statistik ANOVA satu arah, diperoleh perbedaan yang signifikan pada semua kelompok perlakuan. Hasil rata-rata jumlah IgG menunjukkan urutan potensi sebagai imunostimulator respon imun humoral terhadap vaksin hepatitis B dari masing-masing kelompok perlakuan. Dari gambar di atas dapat diketahui kelompok perlakuan yang memiliki aktivitas meningkatkan produksi antibodi IgG terbesar adalah fraksi 2. Urutan berikutnya fraksi 1, disusul fraksi 5, 4 dan 3. Antara fraksi 1 dan 2 mempunyai jumlah yang sama tinggi jika dibandingkan dengan rata-rata kelompok fraksi yang lain sehingga perlu dilakukan uji statistik LSD untuk mengetahui signifikasi antar fraksi. Fraksi 2 mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap semua kelompok perlakuan sedangkan fraksi 1 meskipun mempunyai nilai yang tinggi tapi tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap fraksi 3, 4 dan kontrol positif. Nilai optical density dari kelompok kontrol positif (Imboost®) menunjukkan perbedaan yang signifikan dibanding kelompok kontrol (CMC 1%). Hal ini menunjukkan bahwa Imboost® dengan kandungan ekstrak echinaceae mempunyai kemampuan meningkatkan produksi IgG atau mempunyai efek sebagai imunostimulator respon imun humoral terhadap vaksin hepatitis B.

Berdasarkan besar dosis yang diberikan kepada kelompok perlakuan masing-masing fraksi berbeda. Penurunan jumlah IgG terjadi pada fraksi 3 dengan dosis yang terbesar dibandingkan dengan fraksi yang lainnya. Hal ini terjadi kemungkinan karena adanya kejenuhan reseptor pada sel limfosit untuk merespons stimuli dari fraksi 3 sehingga tidak terjadi peningkatan jumlah IgG atau adanya kandungan senyawa yang berbeda-beda antara kelompok fraksi sehingga memberikan perbedaan aktivitas juga. Fraksi 2 dengan besar dosis yang tidak jauh berbeda dengan kontrol positif Imboost® menunjukkan aktivitas peningkatan jumlah IgG paling tinggi dibanding fraksi lainnya. Dosis terkecil dari fraksi 4 mempunyai aktivitas yang hampir sama dengan fraksi 3 yaitu kurang menunjukkan aktivitas tetapi bila dibandingkan

dengan kelompok kontrol negatif masih ada perbedaan yang bermakna sehingga kedua fraksi ini juga mempunyai peran dalam mempengaruhi respon secara humoral meskipun dengan aktivitas yang kecil.

Hasil penentuan aktivitas imunostimulator berdasarkan jumlah titer antibodi IgG, pengujian terhadap ekstrak herba sambiloto dengan metode ELISA tidak langsung menunjukkan bahwa ekstrak dari pelarut n-Heksan mempunyai jumlah titer antibodi tertinggi dibanding ekstrak etil asetat dan metanol. Perbedaan aktivitas biologis dalam mempengaruhi produksi antibodi kemungkinan disebabkan sifat fisika kimia kandungan senyawa dalam masing-masing ekstrak berbeda. Sifat fisika kimia memegang peranan penting dalam pengangkutan obat untuk mencapai reseptor. Sebelum mencapai reseptor, molekul obat harus melewati sawar membran sehingga sifat fisika kimia berperan dalam absorbsi dan distribusi obat.

Peningkatan produksi Antibodi tertinggi terjadi pada mencit dengan pemberian ekstrak n-heksan, golongan senyawa yang dapat ditarik oleh pelarut ini adalah bersifat non polar misalnya terpenoid. Senyawa yang bersifat non polar bersifat mudah larut dalam lemak dengan nilai KD yang besar sehingga semakin mudah menembus membran sel secara difusi. Semakin banyak senyawa yang dapat menembus membran sel kemungkinan senyawa ini untuk berinteraksi dengan reseptor semakin besar dan aktivitas biologisnya semakin meningkat.

Peningkatan respon imun secara humoral dari ekstrak n-heksan kemungkinan juga disebabkan pengaruh lamanya penyimpanan antigen dalam tubuh. Senyawa yang bersifat lipofilik yang tahan terhadap proses metabolisme akan diakumulasikan pada jaringan lemak, sehingga akan tersimpan lama. Antigen yang tersimpan lama dalam tubuh akan memberi kesempatan pada sistem limfoid untuk menuju ke antigen, dimungkinkan populasi dari limfosit T dan B meningkat sehingga respon imun juga semakin meningkat (Baratawidjaya, 2004; Roitt, 2003).

Hasil fraksinasi dari ekstrak n-Heksan dengan Kromatografi Kolom Vakum menggunakan eluen secara gradient. Lima belas fraksi yang dihasilkan selanjutnya dikelompokkan menjadi lima fraksi yaitu Fraksi 1; Fraksi 2; Fraksi 3; Fraksi 4 dan Fraksi 5, penggabungan ini berdasarkan profil kromatogram yang sama.

Penentuan fraksi teraktif sebagai imunostimulator berdasarkan peningkatan jumlah titer IgG. Fraksi 2 mempunyai aktivitas yang tinggi dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang lain berdasarkan peningkatan jumlah titer IgG. Fraksi teraktif sebagai imunostimulator bila dibandingkan dengan ekstrak n-heksan mempunyai perbedaan, fraksi 2 dengan nilai optical density sebesar 1,180 ± 0,11 dan ekstrak n-heksan 1,257 ± 0,16.

Berdasarkan hasil peningkatan jumlah IgG tersebut menunjukkan ekstrak n-heksan setelah dilakukan fraksinasi mempunyai aktivitas yang sedikit menurun yaitu ditandai dengan menurunnya

jumlah titer antibodi yang dapat diproduksi oleh mencit Balb/c.

Perbedaan aktivitas kemungkinan dipengaruhi oleh senyawa-senyawa yang terkandung di masing-masing fraksi. Hasil identifikasi secara kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sesuai dan berbagai pereaksi semprot di perkirakan fraksi 1 mengandung golongan senyawa terpenoid. F2 mengandung golongan senyawa terpenoid, steroid dan flavonoid. F3 mengandung golongan senyawa terpenoid; F4 mengandung golongan senyawa alkaloid dan terpenoid.

Berdasarkan hasil identifikasi secara KLT bahwa fraksi 2 mempunyai jenis golongan senyawa kimia yang terbanyak dibanding fraksi yang lain, dimungkinkan ada efek sinergisme antar senyawa sehingga fraksi 2 ini mempunyai aktifitas
sebagai imunostimulator yang kuat dibanding kelompok perlakuan yang lain. Senyawa-senyawa flavonoid, terpen menurut Wagner (1985) dapat mempengaruhi aktivitas respon imun.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan ekstrak n-heksan mempunyai aktivitas sebagai imunostimulator yang lebih kuat dibandingkan ekstrak etil asetat

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2006, *Hepatitis B*, www.liverfoundation.org, diakses tanggal 5 Februari 2008.

Burgess, G.W., 1994, Prinsip Dasar ELISA dan Variasi Konfigurasi, dalam Burgess, B.W., *ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*, diterjemahkan oleh Wayan T. Artama, Gadjah Mada University, Jogjakarta.

Burmester, G.R., Antonio, P., 2003, *Color Atlast of Imunology*, Thieme Stuttgar Germany.

Chang, M.H. 2003, Decreasing Incidence of Hepatocellular Carcinoma among Children following Universal hepatitis B immunization, *Liver International* (5): 309-314.

Channel, R.J.P., 1998, *Natural Product Isolation*, Humana Press Inc., New Jersey

Ediati,S., 2007, The Immunomodulatory Mechanism Extract of Morinda citrifolia L., Fruit on Hepatocelluler Carcinoma of Mice, *International Conference On Traditional Medicine And Medicinal Plants*, Surabaya, 8-9

Liang, C., Qiu, F., Wang, N., Yao, X., 2004, *Four New Andrographolide Metabolites in Human Urine*, Traditional Chinese Medicines & Natural Products Research Center Shenzhen

Sarker., S.D., Zahid Latif, Z., Gray, A.I.,2006, *Natural Products Isolation Second Edition*, Humana Press Inc., New Jersey

Sheeja, K., Kuttan G., 2007, *Activation of cytotoxic T lymphocyte responses and attenuation of tumor growth in vivo by Andrographis paniculata extract and andrographolide, in Immunopharmacol Immunotoxicol*, Department of Immunology, Amala Cancer Research Centre, Amala Nagar, Thrissur, India 29(1):81-93.

Wagner, H., 1984, *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, p. 164

Widyawaruyanti, A., 1999, *Uji Imunostimulan Andrographolid Terhadap Sekresi IFN-γ Dan TNF-ά Oleh Sekresi Limfosit T Helper-1 Mencit Dalam Percobaan Kultur Sel*, Abstrak, AirLangga University Library

Xu Y, A. Chen, S. Fry, R.A. Barrow, R.L, Marshall and T.K.S.Mukkur., 2007, Modulation of immune response in mice immunised with an inactivated Salmonella vaccine and gavaged with Andrographis paniculata extract or andrographolide. *Int Immunopharmacology*.