

**PSI  
52**

Jakarta

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

**EFEK ANTI TUMOR KOMBINASI**

**Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)**

**TERHADAP SUB POPULASI LIMFOSIT T DAN MAKROFAG**

**MENCIT BERTUMOR MAMAE**



Penyusun

Tri Wahyuni Lestari

**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
KEMENTERIAN KESEHATAN  
2012**

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan

PERPUSTAKAAN

Tanggal : 18-6-2013

No. Induk : \_\_\_\_\_

No. Klas : PS 1

52

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

**EFEK ANTI TUMOR KOMBINASI**

**Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)**

**TERHADAP SUB POPULASI LIMFOSIT T DAN MAKROFAG**

**MENCIT BERTUMOR MAMAE**



Penyusun

Tri Wahyuni Lestari

**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
KEMENTERIAN KESEHATAN  
2012**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas segala rahmat dan hidayah-Nya, karena telah terselesaikannya penyusunan laporan penelitian Efek Antitumor Kombinasi Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) Terhadap Sub populasi Limfosit T dan Makrofag mencit bertumor mamae.

Hasil penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data keamanan dan khasiat anti tumor dari kombinasi ekstrak *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L. pada mencit bertumor mamae secara in vitro dan in vivo, sehingga dapat memberikan sumbangan informasi kepada masyarakat.

Melalui kesempatan ini, kami menyampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya dan ucapan terima kasih kepada semua pihak terutama tim peneliti dan konsultan serta Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, atas sumber pembiayaan yang telah disediakan, sehingga penelitian dapat berjalan sebagaimana mestinya.

Jakarta, Desember 2012  
Ketua Pelaksana Penelitian

Tri Wahyuni Lestari, S.Farm  
197705292000032001

## ABSTRAK

Kanker payudara merupakan bentuk penyakit keganasan yang menyerang wanita. Kanker tertinggi yang diderita wanita Indonesia adalah kanker payudara dengan angka kejadian 26 per 100.000 perempuan. Penatalaksanaan kanker payudara berhubungan dengan imunosurveilans penderitanya. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data keamanan dan khasiat anti tumor kombinasi ekstrak Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)(Ekstrak RMM), terhadap respon imun mencit bertumor mammae.

Percobaan dilakukan dengan desain eksploratif, Rancang Acak Lengkap (RAL). Untuk mendapatkan data keamanan dilakukan uji toksisitas akut oral menggunakan tikus putih, galur *Wistar* jenis kelamin jantan dan betina, umur  $\pm$  3 bulan dengan bobot badan  $\pm$  160 -180 gram, pada 5 kelompok dosis, jumlah hewan untuk setiap kelompok 5 ekor jantan dan 5 ekor betina. Pada uji *in vivo* pada mencit strain C3H bertumor yang diberi perlakuan (Ekstrak RMM), selama 19 hari; yaitu kelompok kontrol dan tiga kelompok variasi dosis yaitu dosis 1 (7,5 g/kg); dosis 2 (15 g/kg bb); dosis 3 (22,5g/kg bb). Analisis pengaruh pemberian ekstrak RMM terhadap subset limfosit T (CD4, CD8, CD25 dan CD64) serta aktifitas makrofag (CD64<sup>+</sup>CD54 (ICAM) dan CD64<sup>+</sup>CD106 (VCAM)) pada suspensi limpa mencit bertumor dilakukan secara *flow cytometry*. Selain itu juga dilakukan pengukuran berat tumor dan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan AgNOR untuk menilai proliferasi tumor. Data dianalisis dengan One Way Anova, dilanjutkan dengan uji BNT.

Hasil uji toksisitas oral tikus menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak RMM sampai dengan dosis 13501 mg/kg bb, dinyatakan aman. Hasil uji *in vivo* pada mencit bertumor menunjukkan bahwa efek ekstrak RMM terhadap jumlah relatif subset limfosit T (CD4, CD8, CD25) pada keempat kelompok mencit tidak berbeda bermakna secara statistik ( $p=0,05$ ). Jumlah relatif makrofag (CD64) dan aktifitas makrofag CD64<sup>+</sup>CD54(ICAM) dan CD64<sup>+</sup>CD106(VCAM) kelompok dosis 2250 mg/kg bb berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresikan IL2 kelompok dosis 2250 mg/kg bb berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Hasil histopatologi dengan pewarnaan AgNOR pada kelompok mencit dosis 2250 mg/kg bb menunjukkan tingkat proliferasi tumor terendah dibanding ketiga kelompok perlakuan lainnya.

Penghambatan tumor terbaik ditunjukkan oleh perlakuan ekstrak RMM pada kelompok mencit 2250 mg/kg bb, hal ini digambarkan oleh proliferasi tumor terendah. Pada kelompok 2250 mg/kg bb dihasilkan ekspresi IL2 tertinggi, begitu pula dengan jumlah dan aktifitas makrofag berbeda bermakna dengan kontrol. Berdasarkan uji toksisitas, maka dosis yang digunakan dalam percobaan masih merupakan dosis yang aman. Dengan demikian ekstrak RMM pada dosis uji merupakan ekstrak yang aman dan berkhasiat imunomodulator dan antitumor.

**Judul Penelitian: EFEK ANTI TUMOR KOMBINASI Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) TERHADAP SUB POPULASI LIMFOSIT T DAN MAKROFAG MENCIT BERTUMOR MAMAE**

**RINGKASAN**

Kanker payudara merupakan bentuk penyakit keganasan yang menyerang wanita. Kanker tertinggi yang diderita wanita Indonesia adalah kanker payudara dengan angka kejadian 26 per 100.000 perempuan. Penatalaksanaan penderita kanker payudara berhubungan dengan sistem imunitas penderitanya, dalam hal ini termasuk diantaranya yaitu peran limfosit T dan makrofag. Penelitian senyawa antikanker dari bahan alam banyak dilakukan untuk menemukan senyawa antikanker yang tinggi efikasinya, bersifat imunomodulator dan mempunyai toksisitas yang lebih rendah dibanding sitostatika konvensional. Pada penelitian ini akan dilakukan uji antitumor dan imunomodulator dari kombinasi Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran *Phyllanthus niruri* L.

Percobaan dilakukan dengan desain eksploratif, Rancang Acak Lengkap (RAL). Untuk mendapatkan data keamanan dilakukan uji toksisitas akut oral menggunakan tikus putih, galur *Wistar* jenis kelamin jantan dan betina, umur  $\pm$  3 bulan dengan bobot badan  $\pm$  160 -180 gram, pada 5 kelompok dosis, jumlah hewan untuk setiap kelompok 5 ekor jantan dan 5 ekor betina. Pada uji in vivo pada mencit strain C3H bertumor yang diberi perlakuan (Ekstrak RMM), selama 19 hari yaitu:, mencit dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan tiga kelompok variasi dosis yaitu dosis 1 (7,5 g/kg); dosis 2 (15 g/kg bb); dosis 3 (22,5g/kg bb). Analisis pengaruh pemberian ekstrak RMM terhadap subset limfosit T (CD4, CD8, CD25) serta jumlah dan aktifitas makrofag (CD64<sup>+</sup>CD54 (ICAM) dan CD64<sup>+</sup>CD106(VCAM)) pada suspensi limpa mencit bertumor dilakukan secara *flow cytometry*. Selain itu juga dilakukan pengukuran berat tumor dan pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan AgNOR untuk menilai proliferasi tumor. Data dianalisis dengan One Way Anova, dilanjutkan dengan uji BNT.

Hasil uji toksisitas oral tikus menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak RMM sampai dengan dosis 13501 mg/kg bb, dinyatakan aman. Hasil uji in vivo pada mencit bertumor menunjukkan bahwa efek ekstrak RMM terhadap jumlah relatif subset

limfosit T (CD4, CD8, CD25) pada keempat kelompok mencit tidak berbeda bermakna secara statistik ( $p=0,05$ ). Jumlah relatif makrofag (CD64) dan aktifitas makrofag CD64<sup>+</sup>CD54(ICAM) dan CD64<sup>+</sup>CD106(VCAM) kelompok dosis 2250 mg/kg bb berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresikan IL2 kelompok dosis 2250 mg/kg bb berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Hasil histopatologi dengan pewarnaan AgNOR pada kelompok mencit dosis 2250 mg/kg bb menunjukkan tingkat proliferasi tumor terendah dibanding ketiga kelompok perlakuan lainnya.

Penghambatan tumor terbaik ditunjukkan oleh kelompok mencit dosis 3, hal ini digambarkan oleh proliferasi tumor terendah. Pada kelompok dosis 3 dihasilkan ekspresi IL2 tertinggi, begitu pula dengan jumlah dan aktifitas makrofag berbeda bermakna dengan kontrol. Berdasarkan uji toksisitas, maka dosis yang digunakan dalam percobaan masih merupakan dosis yang aman. Dengan demikian ekstrak RMM pada dosis uji merupakan ekstrak yang aman dan berkhasiat imunomodulator dan antitumor.

## DAFTAR ISI

	HAL
KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK .....	ii
RINGKASAN EKSEKUTIF .....	iii
DAFTAR TABEL .....	iv
LAMPIRAN .....	v
I. PENDAHULUAN .....	1
II. MANFAAT .....	3
III. TUJUAN .....	3
IV. METODE PENELITIAN .....	5
V. PERTIMBANGAN ETIK .....	20
PENELITIAN	
VI. HASIL PENELITIAN .....	21
VII. KETERBATASAN .....	29
PENELITIAN	
VII. PEMBAHASAN .....	29
XI. KESIMPULAN .....	33
X. SARAN .....	33
XI. DAFTAR PUSTAKA .....	34
XII. SUSUNAN TIM PENELITI .....	35
XIII. BIODATA KETUA .....	36
PELAKSANA	
XIV. REKAPITULASI .....	37
REALISASI BIAYA	

## DAFTAR TABEL

		hal
Tabel 1.	Rata-rata pertambahan bobot badan tikus pada uji toksisitas ekstrak etanol 70% rumput mutiara	22
Tabel 2.	Rata-rata pertambahan bobot badan tikus pada uji toksisitas ekstrak etanol 70% meniran	23
Tabel 3.	Rata-rata pertambahan bobot badan tikus pada uji toksisitas kombinasi ekstrak etanol 70% herba rumput mutiara dan meniran	24
Tabel 4.	Karakteristik non spesifik ekstrak meniran dan rumput mutiara	25
Tabel 5.	Penapisan fitokimia meniran dan rumput mutiara	26
Tabel 6.	Penetapan kadar phyllantin dan asam ursolat yang terkandung dalam ekstrak.	26
Tabel 7.	Hasil analisis suspensi limpa mencit bertumor pada uji in vivo	27
Tabel 8.	Hasil histopatologi dengan pewarnaan AgNOR	28

## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Gambaran Histopatologi Pewarnaan AgNOR pada Kelompok Kontrol
- Lampiran 2. Gambaran Histopatologi Pewarnaan AgNOR pada Kelompok Dosis 1 ( 750mg/kg bb )
- Lampiran 3. Gambaran Histopatologi Pewarnaan AgNOR pada Kelompok Dosis 2 ( 1500 mg/kg bb )
- Lampiran 4. Pewarnaan AgNOR pada preparat histopatologi tumor mencit C3H (rangkuman)
- Lampiran 5. Penyiapan transplantasi tumor
- Lampiran 6. Mencit perlakuan dan hasil tumor mencit
- Lampiran 7. Penapisan Fitokimia pada pengujian tanin
- Lampiran 8. Penapisan Fitokimia pada pengujian alkaloid dengan pereaksi Mayer
- Lampiran 8. Penapisan Fitokimia pada pengujian alkaloid dengan pereaksi Dragendorf
- Lampiran 9. Penapisan Fitokimia pada pengujian steroid dan Triterpenoid
- Lampiran 10. Penapisan Fitokimia pada pengujian Turunan kinon
- Lampiran 11. Kromatogram Ekstrak Meniran
- Lampiran 12. Kromatogram Ekstrak Rumput Mutiara

## I. LATAR BELAKANG

Kanker payudara merupakan bentuk penyakit keganasan yang menyerang wanita. Kanker tertinggi yang diderita wanita Indonesia adalah kanker payudara dengan angka kejadian 26 per 100.000 perempuan, disusul kanker leher rahim dengan 16 per 100.000 perempuan.<sup>1</sup> Penatalaksanaan penderita kanker payudara berhubungan dengan sistem imunitas penderitanya karena seperti pada umumnya penyakit keganasan, kanker berhubungan dengan lemahnya *immunologic surveillance* penderitanya. Pembahasan tentang *immunologic surveillance* tidak dapat dipisahkan dari pembahasan tentang peran limfosit T dan *antigen presenting cell* (APC).

Limfosit T dapat bertindak sebagai efektor dalam respon imun, tetapi dapat pula bertindak sebagai regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktifitas sel imunokompeten lainnya melalui limfokin yang dilepaskannya. Limfosit T-helper (Th) dan T-supresor (Ts) mempengaruhi produksi imunoglobulin oleh limfosit B.<sup>2,3</sup>

Dalam memproses antigen tumor *in vivo* akan melibatkan baik respon imun humoral maupun seluler. Sampai saat ini belum ada bukti antibodi secara sendiri dapat menghambat perkembangan/pertumbuhan sel tumor. Dengan demikian respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler.<sup>4</sup>

Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah: limfosit T, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), sel NK dan makrofag. Pemantauan terhadap pertumbuhan sel tumor yang dilakukan oleh limfosit T dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Pemantauan secara langsung dilakukan oleh subset limfosit T cytotoxic atau Tc (CD8+/MHC I restricted T cells). Subset ini mensekresi limfokin yang berpengaruh langsung dalam melisis sel tumor melalui pengrusakan membran sel dan nukleus.<sup>2,4</sup> Sedangkan pemantauan secara tidak langsung, dilakukan oleh limfosit T, yaitu subset T helper atau Th(CD4+/MHCII restricted T cells). Subset ini menghasilkan limfokin yang dapat mengaktifasi sel efektor lain dan menginduksi terjadinya respon radang. Sel efektor lain yang diaktivasi meliputi Tc, makrofag, NK dan sel B. Sel-sel tersebut kemudian

menghasilkan limfokin lain seperti limfotoksin/tumor necrotic factor (TNF) yang dapat melisis sel tumor secara langsung.<sup>5</sup>

Untuk melakukan fungsi-fungsi tersebut dengan baik, limfosit T perlu melalui proses aktivasi sebelumnya. Aktivasi limfosit T terjadi karena pengenalan antigen yang telah diproses oleh antigen presenting cell (APC).<sup>2,3,4,5</sup> Kemudahan limfosit T untuk menjadi aktif, dipengaruhi oleh kualitas interaksi APC-limfosit T, dalam hal ini adalah limfosit T helper.<sup>4,5</sup>

Akhir-akhir ini berkembang penelitian tanaman obat sebagai antikanker yang bertujuan untuk menemukan tanaman obat yang berpotensi sitostatik dan imunomodulator serta memiliki toksisitas yang rendah dibanding obat sitostatika konvensional. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tanaman obat antikanker yang komprehensif hingga ke tingkat molekuler dengan memperhatikan interaksi antar sel.

Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) secara tradisional sering digunakan dalam membantu pengobatan kanker payudara. Rumput mutiara mengandung senyawa asam ursolat yang berkhasiat antitumor. Aktivitas antioksidan ekstrak alkohol 70% rumput mutiara konsentrasi 500 ppm dapat menghambat laju pembentukan MDA (malonaldehid).<sup>6</sup> Pengamatan dengan metode imunohistokimia terhadap protein c-Myc pada jaringan payudara tikus *Sprague Dowley* yang diberi perlakuan ekstrak etanolik herba rumput mutiara, pada dosis 750 mg/kgBB mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara.<sup>7</sup> Ekstrak etanolik *H.corymbosa* mampu menghambat proliferasi sel hepar dengan aktivitas yang tidak berbeda signifikan antara dosis 750 mg/kgBB dan dosis 1500 mg/kgBB.<sup>8</sup>

Diantara perbandingan etanol-air yang di uji, hasil yang terbaik ditunjukkan oleh perbandingan etanol-air perbandingan 60:40 sebagai pelarut ekstraksi untuk herba meniran guna memperoleh senyawa fenolat terbanyak yang berkhasiat antioksidan.<sup>9</sup>

Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) digunakan untuk menstimulasi sistem imun. Pemberian ekstrak meniran selama 7 hari dapat meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag pada mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella sp.* dengan indek fagositosis tertinggi pada dosis 250 µg/hari.<sup>10</sup> Pemaparan ekstrak meniran pada sel tumor

*adenocarcinoma* mencit C3H secara *invitro* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna dengan kelompok kontrol.<sup>11</sup>

Skreening efek sitotoksik ekstrak *Phyllanthus spp* menggunakan *MTS reduction assay* menunjukkan bahwa ekstrak metanol dengan IC50 50–180 µg/ml dan ekstrak air dengan IC50 65–470 µg/ml menghambat pertumbuhan sel kanker MCF-7 (*breast carcinoma*) and A549 (*lung carcinoma*) serta menunjukkan toksisitas yang rendah terhadap sel normal pada perlakuan hingga konsentrasi 1000 µg/ml. Komponen polyfenol yang terkandung pada ekstrak *Phyllanthus spp*. adalah gallic acid, galloylglucopyronside, digalloylglucopyronside, trigalloylglucopyronside, tetragalloylglucopyronside, corilagen, geraniin, rutin, quercetin glucoside, quercetin diglucoside, quercetin rhamnoside, and caffeolquinic acid.<sup>12</sup>

Berdasarkan uraian diatas maka pada penelitian ini akan diuji khasiat kombinasi ekstrak tersebut sebagai imunomodulator dan anti tumor setelah sebelumnya dilakukan uji toksisitas akut.

## II. MANFAAT

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan data baru mengenai toksisitas dan efek imunomodulator dan antitumor mammae dari kombinasi ekstrak *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L.

## TUJUAN

### 3.1. Tujuan umum

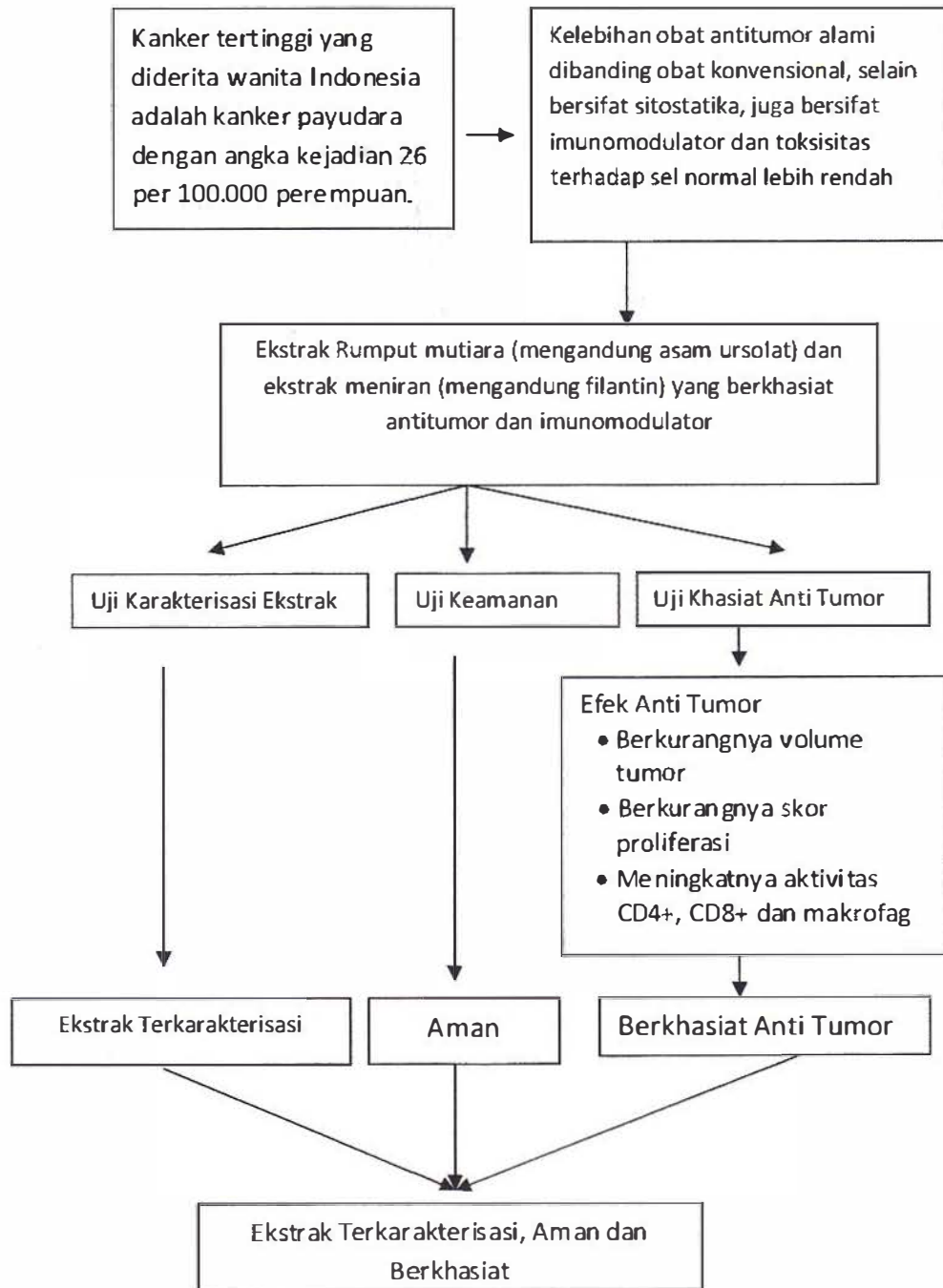
Untuk mendapatkan data keamanan dan khasiat anti tumor dari kombinasi ekstrak *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L. pada mencit bertumor mammae *dependent hormonal* dan *independent-hormonal* secara *in vitro* dan *in vivo*.

### 3.2. Tujuan Khusus

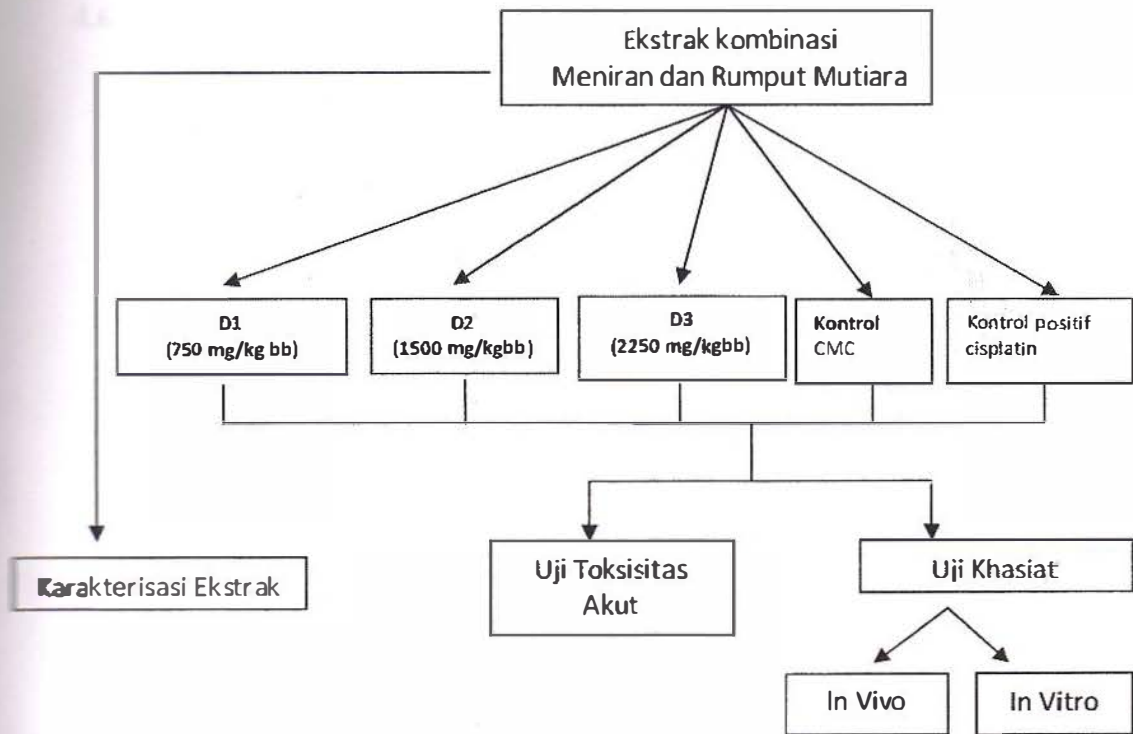
- Menilai tingkat keamanan kombinasi (LD50) ekstrak rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan meniran (*Phyllanthus niruri* L.).
- Mengidentifikasi karakter ekstrak rumput mutiara dan meniran.
- Mengukur dan membandingkan aktivitas CD4+ secara in vivo, pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara.
- Mengukur dan membandingkan aktivitas sitotoksik CD8+ secara in vivo, pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara.
- Mengukur dan membandingkan aktivitas makrofag secara invivo, pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara.
- Mengukur dan membandingkan aktivitas CD4+ secara invitro, pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara.
- Mengukur dan membandingkan aktivitas sitotoksik CD8+ secara invitro, pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara.
- Mengukur dan membandingkan aktivitas makrofag secara invitro, pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara.
- Mengukur dan membandingkan volume tumor pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara.
- Menilai proliferasi sel tumor pada mencit C3H dan GR diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara secara mikroskopik.


#### IV. METODE PENELITIAN

##### 4.1. Kerangka Pikir



## 4.2. Alur Kerja



Ket:  Tidak dapat dilakukan karena keterbatasan jumlah mencit

## 4.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian :

Penelitian dilakukan di Laboratorium hewan coba, dan Laboratorium imunologi Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; meliputi pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dan pemeriksaan dengan flowcytometri. Sedangkan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan AgNOR, dilakukan di Patologi Anatomi FK UI.

Waktu penelitian:

Penelitian dilakukan selama bulan Januari sampai dengan Oktober 2012.

## 4.4. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium.

#### 4.5. Desain penelitian

Desain penelitian adalah eksploratif, dengan rancangan acak lengkap (RAL).

#### 4.6. Populasi dan Sampel

Populasi: mencit strain C3H 2 bulan untuk uji antitumor dan Tikus Wistar kelamin jantan dan betina untuk uji toksisitas.

Sampel: sampling berdasarkan berat badan, dengan berat rata-rata 15-20 gr untuk mencit dan berat 160 - 180 gr untuk tikus, dengan rincian sebagai berikut;

Hewan coba	In vivo	In vitro
Mencit C3H	40 ekor betina	30 ekor betina
Mencit GR	40 ekor betina	30 ekor betina
Tikus Wistar (untuk 3x uji toksisitas)	120 ekor jantan 120 ekor betina	-

#### 4.7. Estimasi Besar Sampel, Cara Pemilihan dan Penarikan Sampel

Besar sampel ditentukan berdasar rumus empiris Frederer sebagai berikut.

$(t-1) (n-1) \geq 15$  dimana  $t$  = Jumlah beda perlakuan terhadap hewan uji;  $n$  = jumlah ulangan (tikus). Jadi jumlah minimum tikus dalam tiap kelompok adalah 4 ekor.

#### 4.8. Pemeliharaan Hewan

Hewan percobaan ditempatkan pada kandang ukuran 425 x 260 x 185 mm, yang terbuat dari poly carbonat. Hewan ditempatkan pada rak kandang dalam ruangan dengan pencahayaan dan sirkulasi udara yang baik. Suhu ruangan sesuai dengan suhu kamar, dengan kelembabkan udara sekitar 26 – 27 %.

#### 4.9. Variabel

- Uji toksisitas akut :

- variabel tergantung adalah jumlah kematian mencit.
- variabel bebas adalah variasi dosis.

- Uji imunomodulator
  - variabel tergantung adalah CD4+,CD8+, CD25 dan aktivitas makrofag, proliferasi tumor.
  - variabel bebas adalah variasi dosis

#### 4.9. Bahan dan Cara kerja

##### 4.9.1. Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu: kaliper untuk mengukur diameter tumor, dan alat flowcytometri untuk pemeriksaan respon imun, gelas kimia, gelas ukur, spatula, labu, rotary evaporator (Buchi), timbangan analitik, seperangkat alat bedah, spuit.

##### 4.10.2. Hewan coba

Penelitian ini menggunakan hewan percobaan berupa 2 strain mencit yaitu C3H. Pemilihan strain mencit ini, karena merupakan hewan model untuk tumor kelenjar susu dengan insiden tumor kelenjar susu yang cukup tinggi, dan sudah memperhatikan prinsip 3R (Replacement, Refinement, Reducement). Perbedaan diantara kedua strain tersebut terdapat pada ketergantungannya pada pengaruh hormon dalam bentuk tumor kelenjar susu. Mencit C3H tidak memerlukan pengaruh hormon dalam tumorigenesis.

Untuk toksisitas akut oral menggunakan hewan percobaan tikus putih, galur *Wistar* jenis kelamin jantan dan betina, umur  $\pm$  3 bulan dengan bobot badan 160- 180 gram.

Adapun pembagian kelompok percobaan adalah sebagai berikut :

Uji Toksisitas Akut ( $LD_{50}$ ) meliputi;

$LD_{50}$  Rumput Mutiara : terdiri dari 5, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina.

$LD_{50}$  Meniran : terdiri dari 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina.

$LD_{50}$  Kombinasi Rumput mutiara dan Meniran : terdiri dari 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina.

#### Uji in vivo

Mencit C3H : terdiri dari 4 kelompok (kontrol negatif, dosis 1, dosis 2 dan dosis 3). Masing masing kelompok terdiri dari 5 ekor.

#### 4.10.3. Bahan

- Rumput mutiara kebun obat Karyasari, Bogor dan meniran berasal dari Balitro Bogor.
- Bahan uji berupa kombinasi ekstrak etanol 70% *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L., yang dibuat secara maserasi.

#### 4.10.4. Cara Kerja:

##### 4.10.4.1. Pembuatan ekstrak etanol *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L.

Pembuatan ekstrak yang digunakan dalam percobaan ini dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Masing-masing simplisia dikeringkan, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan berukuran 40. Serbuk ditimbang sejumlah 250 g dibasahi dengan pelarut etanol 96% didiamkan selama 18 jam dalam wadah tertutup dari gelas. Ekstrak cair yang diperoleh dikentalkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak kental diuapkan dalam cawan porselen yang telah ditara kemudian diuapkan di atas tangas air dengan suhu  $\pm 40^{\circ}$  C hingga etanol menguap dan diperoleh ekstrak kering. Rendemen ekstrak dihitung.<sup>13</sup>

##### 4.10.4.2. Karakterisasi Ekstrak<sup>20</sup>

Karakteristik ekstrak dilakukan dengan 2 tahap yaitu tahap 1 karakteristik non spesifik dan karakteristik spesifik.

###### a. Karakteristik non spesifik meliputi :

###### 1. Penetapan Kadar Air

Lebih kurang 10 gram ekstrak dimasukkan ke dalam labu destilasi yang telah terhubung dengan alat destilasi, yang telah terisi dengan 200 mL

toluen. Kemudian panaskan pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Setelah 2 jam diukur volume air yang ditampung pada tabung pengukur.

2. Penetapan Susut Pengerinan

Ditimbang ekstrak lebih kurang 1 gram dimasukkan dalam botol timbang bertutup yang telah ditara. Kemudian dipanaskan pada suhu  $110^{\circ}\text{C}$  sampai berat konstan.

3. Penetapan Kadar Abu Total

Lebih kurang ditimbang 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam krus silika bertutup yang telah ditara. Kemudian dipijarkan dengan panas  $700-800^{\circ}\text{C}$  sampai arang habis kemudian didinginkan ditimbang, jika arang tidak habis tambahkan dengan air panas dan disaring. Filtrat dipanaskan sampai berat tetap.

4. Penetapan Kadar Abu Larut dalam Asam

Hasil penetapan kadar abu total ditambahkan HCl encer 2% secukupnya. Kemudian disaring dipanaskan sampai berat tetap.

b. Penetapan karakteristik spesifik meliputi :

1. Penetapan Kadar Sari Larut dalam etanol

Lebih kurang ditimbang 5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam botol bertutup dan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95 %. Kemudian dikocok dengan menggunakan *shaker* selama 6 jam kemudian disaring. Hasil saringan diambil 20 mL filtrat dan masukkan ke dalam cawan yang susah ditara. Cawan dipanaskan pada suhu  $110^{\circ}\text{C}$  sampai berat konstan.

2. Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Lebih kurang ditimbang 5 g ekstrak dimasukkan ke dalam botol bertutup dan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air. Kemudian dikocok dengan menggunakan *shaker* selama 6 jam kemudian disaring. Hasil saringan diambil 20 mL filtrat dan masukkan ke dalam cawan yang susah ditara. Cawan dipanaskan pada suhu  $110^{\circ}\text{C}$  sampai berat konstan.

### 3. Profil Kromatogram Ekstrak

Sebanyak 0,5 gram ekstrak diencerkan dengan etanol 70 %,kemudian ditotolkan pada plat yang telah diaktifkan dengan memasukkan ke dalam oven pada suhu 110°C. Selanjutnya masukkan ke dalam *chamber* yang telah diisi dengan larutan pengembang. Setelah larutan pengembang mencapai tinggi 15 cm, maka plat diangkat dan dikeringkan di udara. Kromatogram dilihat dengan menggunakan sinar UV 254nm dan 366 nm, dan dibaca dengan menggunakan densitometer.

#### Penapisan Fitokimia

##### a. Tanin

Sebanyak 20mg sampel tumbuhan yang telah dihaluskan ditambah etanol sampai sampel terendam. Kemudian sebanyak 1 ml larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah Fe Cl<sub>3</sub> 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau.

##### a. Saponin

Sebanyak 2 g sampel tumbuhan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah air suling sehingga seluruhnya terendam, dididihkan selama 2-3 menit dan selanjutnya didinginkan, kocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

##### b. Steroid dan triterpenoid

Sebanyak 50-100mg sampel tumbuhan yang telah dihaluskan, ditempatkan pada plat tetes dan ditambahkan asam asetat anhidrat sampai terendam seluruhnya, dibiarkan selama kira-kira 15 menit, enam tetes larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah jingga atau ungu, sedangkan adanya steroid ditunjukkan dengan warna biru.

c. Flavanoid

Sebanyak 200 mg sampel tumbuhan yang telah diekstrak dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g serbuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) dalam waktu 3 menit.

4. Alkaloid

Sebanyak 4 g sampel tumbuhan yang telah dihaluskan ditambahkan kloroform secukupnya lalu dihaluskan lagi. Kemudian ditambah 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Larutan disaring ke dalam tabung reaksi, dan filtrat ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes. Filtrat dikocok dengan teratur kemudian dibiarkan beberapa lama sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 2,5 ml untuk dianalisis dengan pereaksi Mayer, Dragendorf dan Wagner. Terbentuk endapan putih bila direaksikan dengan Mayer, dengan pereaksi Dragendorf terbentuk endapan merah jingga dan pereaksi Wagner terbentuk endapan coklat.

5. Penetapan Kadar Phyllantin dalam ekstrak

- Pembuatan larutan standar.

Standar phyllantin ditimbang sebanyak 2,5 mg, kemudian dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 25 ml. Konsentrasi phyllantin 0,1 mg/ml.

- Pembuatan larutan sampel.

Sampel 100 mg ekstrak meniran dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 ml.

- Kromatografi

Standar phyllantin dan sampel ekstrak meniran ditotolkan pada plat silica gel 60 GF<sub>254</sub> dieluasi dalam chamber yang telah berisi larutan jenuh Toluene: Etil asetat: Asam formiat = 5 : 3,5 : 0,5. Plat yang telah dieluasi kemudian dikeringkan dalam suhu kamar. Konsentrasi Phyllantin dalam ekstrak

Meniran ditentukan dengan menggunakan alat densitometer, dengan menggunakan rumus:

% Phyllantin dalam sampel=

$$\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \frac{[\text{Standar}]}{[\text{Sampel}]} \times \frac{[\text{Vol Totolan Standar}]}{[\text{Vol totolan Sampel}]} \times 100\%$$

#### 6. Penetapan Kadar Asam ursolat dalam ekstrak

- Pembuatan larutan standar.

Standar asam ursolat ditimbang sebanyak 2,5 mg, kemudian dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 25 ml. Konsentrasi asam ursolat 0,1 mg/ml.

- Pembuatan larutan sampel.

Sampel 100 mg ekstrak meniran dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 ml.

- Kromatografi

Standar asam ursolat dan sampel ekstrak meniran ditotolkan pada plat silica gel 60 GF<sub>254</sub> dieluasi dalam chamber yang telah berisi larutan jenuh Kloroform : Metanol= 9 : 1. Plat yang telah dieluasi kemudian dikeringkan dalam suhu kamar. Konsentrasi Asam ursolat dalam ekstrak Meniran ditentukan dengan menggunakan alat densitometer, dengan menggunakan rumus:

% Asam ursolat dalam sampel=

$$\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times \frac{[\text{Standar}]}{[\text{Sampel}]} \times \frac{[\text{Vol Totolan Standar}]}{[\text{Vol totolan Sampel}]} \times 100\%$$

#### 4.9.4.3. Toksisitas Akut oral (LD<sub>50</sub>)

Prinsip

Pemberian dosis tunggal suatu bahan uji secara oral yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan yang dicoba dalam jangka waktu tertentu.

Hewan Percobaan.

Untuk toksisitas akut oral menggunakan hewan percobaan tikus putih, galur Wistar jenis kelamin jantan dan betina, umur + 3 bulan dengan bobot badan + 160 -180 gram.

#### **Jumlah hewan**

LD<sub>50</sub> Rumpun Mutiara : terdiri dari 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina.

LD<sub>50</sub>Meniran : terdiri dari 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina.

LD<sub>50</sub>Kombinasi Rumpun mutiara dan Meniran : terdiri dari 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina.

#### **Dosis**

Pemberian dosis berdasarkan pemakaian empiris pada manusia. Dosis terbesar didasarkan pada jumlah maksimal bahan uji yang secara teknis dapat diterima oleh hewan percobaan. Kemudian dosis diturunkan dengan menggunakan kelipatan dosis. Misalnya Dosis I pemberian 1 x dosis manusia; Dosis II pemberian 4 x dosis manusia; Dosis III pemberian 8 x dosis manusia; Dosis IV pemberian 16 x dosis manusia; Dosis V pemberian 32 x dosis manusia.

#### **Cara pemberian**

Bahan uji diberikan secara oral dan sekali sehari, menggunakan alat sonde lambung yang dipasangkan pada syringe 5 mL.

Tikus dibagi secara acak kedalam 5 kelompok dosis, masing-masing tikus diberi bahan uji maksimal 4 mL / 200 gram bobot badan, dengan cara ujung sonde dimasukkan ke dalam mulut, kemudian perlahan-lahan dimasukkan melalui tepi langit-langit ke belakang sampai esofagus.

#### **Observasi**

Selama 6 jam setelah pemberian bahan uji, hewan diamati secara seksama terhadap adanya gejala toksik dan kematian.

Pengamatan meliputi : tingkah laku (aktivitas spontan, peka sentuhan, rasa nyeri); eksitasi sistem syaraf pusat ( gejala strarub, melompat, tremor,

konvulsi); sistem syaraf otonom (mata midriasis); Refleks (refleks kornea, pinna)

Pengamatan dilanjutkan sampai 24 jam dan dicatat jumlah kematian dalam kelompok, apabila terdapat kematian, maka semua hewan dikorbankan untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi. Apabila tidak ada kematian, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari, dilakukan penimbangan berat badan setiap hari, dicatat terjadinya gejala klinik/toksik yang terjadi, dicatat jumlah kematian, dan dilakukan pengukuran suhu badan.

Pada akhir penelitian, hewan percobaan yang masih hidup dikorbankan dengan melakukan anestesi menggunakan eter 3 mL/ 5 ekor tikus, dilakukan otopsi, dilakukan pengamatan secara makroskopis, dan apabila ada kelainan organ-organ dilakukan pemeriksaan histopatologi.

#### 4.9.4.4. Uji Anti Tumor

##### a. Uji In Vitro

##### Kultur in vitro sel tumor

Tumor mencit diambil dari tubuh mencit secara aseptis. Masa tumor dicacah menjadi sel tunggal dengan penambahan tripsin. Sel dipelihara pada medium RPMI 1640 dengan penisilin, streptomisin, glutamin, sodium piruvat, dan 7% FCS dalam flask 25 ml. Sel yang telah mengalami pasasi minimal dua kali dipilih sebagai sel sasaran pada uji daya sitotoksik<sup>(15,16)</sup>.

##### Kultur in vitro limfosit

Limfosit T sebagai sel efektor diisolasi dari limpa dan kelenjar getah bening (KGB) mencit normal dan mencit bertumor kelenjar susu 2 minggu pasca transplantasi. Limpa dan KGB diletakkan pada cawan 60 mm steril yang berisi 5 ml medium bebas serum. Untuk mendapatkan suspensi limfosit, sel dilewatkan pada nylon net steril. Sedangkan untuk melisis eritrosit dilakukan dengan menambahkan bufer amonium klorida<sup>(17)</sup>.

Suspensi sel diresuspensi menjadi  $5 \cdot 10^6$  sel/ml. Suspensi sel ini dikultur pada medium RPMI mengandung 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine,

100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, dan 50 µM 2-mercaptoethanol. Ekstrak *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L. dengan berbagai dosis yang dipilih ditambahkan sebanyak 100 µl pada masing-masing well kultur limfosit.

#### Kultur in vitro sel makrofag

Sel makrofag diisolasi dari peritoneum mencit bertumor kelenjar susu maupun mencit normal. Pemeliharaan makrofag dilakukan pada medium RPMI mengandung 10% fetal calf serum ( FCS ), 2 mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin dan 50 µM 2-mercaptoethanol. Ekstrak *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L. dengan berbagai dosis yang dipilih ditambahkan sebanyak 100 µl pada masing-masing well kultur makrofag.

#### Fungsi APC

Keaktifan APC diukur dengan mengukur ekspresi ICAM-1 dan VCAM-1 kultur invitro sel makrofag berumur 24, 48 dan 72 jam yang diisolasi dari peritoneum mencit. Pengukuran ekspresi dilakukan dengan flow cytometry.

#### Aktifitas CD4+

Aktifitas CD4+ diukur berdasarkan ekspresi reseptor alfa IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) pada kultur in vitro berumur 24,48 dan 72 jam dari limfosit T limpa mencit bertumor kelenjar susu menggunakan teknik flow cytometry.<sup>(18,19)</sup>

#### Uji daya sitotoksik limfosit CD8+

Daya sitotoksik sel efektor diuji terhadap sel sasaran baik dalam kombinasi alogenik yaitu antara H-2<sup>k</sup> (mencit C3H terhadap H-2<sup>dk</sup> (mencit GR) secara timbal balik (vice-versa), maupun dalam kombinasi singenik yaitu sel efektor dan sel sasaran berasal dari strain sel mencit yang sama.

Dengan kombinasi singenik dan alogenik, sebanyak 100 µl masing-masing sel disarankan diinkubasi ke dalam microwell yang telah diinokulasi terlebih

dahulu dengan 100  $\mu$ L sel efektor sehingga diperoleh ratio sel efektor /sel darah sasaran (E/T) = 50/1. sebagai kontrol dari assay ini diisikan 100  $\mu$ L sel sasaran tanpa sel efektor dengan menambahkan 100  $\mu$ L medium RPMI. Kultur sel efektor-sasaran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam <sup>(18,19)</sup>.

Daya sitotoksik diukur menggunakan *metode non-radioactive cytotoxicity assay*. Inkubasi sel efektor dan sel sasaran pada cakram 96- well. Setelah 20 jam medium dipindah untuk mengukur LDH yang keluar dari sel lisis. Dilakukan sentrifugasi 5 menit pada suhu 4°C, diresuspensi dengan RPMI dan dipindah pada cakram baru. Pada setiap well ditambahkan 50  $\mu$ l substrat, diinkubasi 30 menit pada suhu kamar. Ditambahkan larutan penstrep dan dibaca pada panjang gelombang 490 nm. Persentase sel yang mati ditentukan dengan rumus :

Daya sitotoksik = Experimental LDH release/maximum LDH release

b. Uji in vivo

Uji pertumbuhan tumor

Transplantasi tumor mencit

Pada hari ke-0, dilakukan transplantasi tumor mencit.

Sebelumnya, 30 mencit resipien yang sudah diacak dimasukkan ke dalam kandang masing-masing. Satu kelompok berisi lima ekor mencit dalam satu kandang. Kandang mencit dibuat dengan serbuk kayu dan dilengkapi makanan dan minuman ad libitum.

Transplantasi dilakukan dengan mengeluarkan jaringan tumor dari mencit donor. Pertama-tama mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian jaringan tumor diambil menggunakan alat bedah. Jaringan tumor dimasukkan ke dalam cawan arloji, dilarutkan dengan PBS, dicacah-cacah sampai menjadi bubur tumor yang halus.

Bubur tumor yang sudah halus dan merata tersebut disuntikkan subkutan di daerah lengan kanan bawah tumor resipien sebanyak 0,1 ml, dengan menggunakan spuit 1 cc.

#### Pemberian dosis ekstrak

Pemberian ekstrak bahan uji dimulai hari ke 2, pencekohan dilakukan selama 20 hari. Bahan uji ekstrak rumput mutiara dan meniran diberikan dengan perbandingan 2 : 1. Kelompok dosis sebagai berikut: Kelompok I, dosis 15 mg/kg bb.; Kelompok II, dosis 30 mg/kg bb.; Kelompok III, dosis 45 mg/kg bb.; Kelompok kontrol negatif CMC. Volume bahan ekstrak yang dicekakkan ke mencit sebanyak 0,8 – 1 ml/30 gram bb mencit. Selain pencekohan, setiap hari juga dipantau makanan dan minuman semua kelompok mencit.

#### Pengukuran pertumbuhan tumor mencit

Pengukuran pertumbuhan tumor dimulai sejak hari ke-3. Pengukuran dilakukan dua kali seminggu. Pengukuran dilakukan dengan cara, membasahi kulit badan mencit dengan air, supaya bulu-bulunya tidak mengganggu pengukuran. Pengukuran tumor dilakukan dengan menggunakan kaliper. Yang diukur adalah diameter terbesar dan diameter terkecil dari tumor. Rumus volume tumor yaitu  $\text{Volume} = 0,4 \times \text{diameter terbesar} \times (\text{diameter terkecil})$  pembulatan volume adalah sampai dengan tiga angka di belakang koma.<sup>14</sup>

#### Pengambilan jaringan tumor mencit

Pada akhir penelitian, yaitu pada hari ke-22 dilakukan pengukuran tumor terakhir kali. Sesudah itu mencit dimatikan dengan ketamin, lalu jaringan tumor pada kelenjar mammae dikeluarkan. Setelah dikeluarkan, dilakukan pula pengukuran jaringan tumor yang sudah dikeluarkan tersebut. Sesudah itu jaringan tumor dimasukkan dalam larutan formalin untuk dibuat sediaan AgNOR. Hal ini dilakukan pada setiap mencit.

### **Pengamatan mikroskopis sediaan AgNOR**

Sediaan kelenjar mammae mencit dibuat sediaan mikroskopik, kemudian diwarnai AgNOR di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Skor m Ag NOR menggambarkan banyaknya noktah pada setiap 200 sel tumor yang positif menyerap Ag. Sel yang menyerap Ag menggambarkan sel yang sedang mengalami mitosis (berproliferasi).

### ***Preparasi flowcytometri in vivo***

Pemisahan limfosit dan identifikasi sub populasi sel T

#### **Isolasi limpa**

Mencit disemprot alkohol 70%, kemudian dinarkose dengan ether. Mencit direbahkan miring kiri, kemudian dibuka kulit perut sebelah kiri atas, limpa terlihat berwarna merah. Limpa kemudian diambil menggunakan pinset dan dibebaskan dari lemak. Setelah itu dicuci dengan PBS.

#### **Membuat suspensi sel limpa**

Limpa diletakkan pada cawan petri kemudian digerus sehingga sel terlepas. Suspensi sel dipindah ke tabung sentrifuge 15 ml. Cawan petri dicuci dengan PBS dan cairannya disatukan dalam tabung setrifuge serta ditambah PBS hingga 14 ml. Sentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 15 C. Setelah itu buang supernatannya. Pelet ditambah dengan 1 ml PBS dan homogenkan untuk mendapatkan suspensi sel Limpa. Letakkan pada ice box.

#### **Menghitung Jumlah absolut Limfosit.**

Sebanyak 95 µl suspensi sel limpa ditambah dengan 5 µl Trypan Blue. Segera hitung jumlah sel hidup dengan hemasitometer. Sel yang hidup berwarna bening dan utuh sedangkan sel yang mati berwarna biru dan mengkerut. Jumlah limfosit dikorelasikan dengan jumlah sel hidup.

Jumlah limfosit (sel/ml) = Jumlah sel hidup x banyaknya bilik x Faktor pengenceran x  $10^4$

## PROSEDUR FLOWCYTOMETRI

### Persiapan:

- a. Pengenceran antibodi  
Dipipet sejumlah antibodi (menurut optimasi) dan diencerkan dengan PBS 25x.
- b. Penyiapan Cytofix/Cytoferm 10x  
Dipipet sejumlah cytofix (menurut optimasi) dan diencerkan dengan PBS 10x.
- c. Pengenceran Wash Buffer 10x  
Dipipet 1ml wash buffer diencerkan dengan 9 ml miliQ water

### Staining

Tabung mikrotube diberi masing-masing 0,5-1 ml PBS. Setelah itu masukkan suspensi sel sebanyak 25  $\mu$ l (bila analisa sel surface); 50  $\mu$ l (bila analisa intraselular) dan 100  $\mu$ l (bila berasal dari sel Thymus) setelah sebelumnya dihomogenkan dahulu. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm, 5 menit pada 15°C. Supernatan dibuang. Dalam ruangan bercahaya minimal, pelet ditambahkan antibodi staining 1 (bila hanya 1 staining) dan staining 2 (bila menggunakan 2 staining). Anti bodi yang digunakan untuk staining yaitu anti mouse CD4, anti mouse CD8 dan anti mouse CD64. Setelah itu diinkubasi selama setidaknya 15 menit dalam ice box (ruang gelap). Lanjutkan dengan running *Flow cytometri*.

Bila akan dilanjutkan staining intraselular, setelah inkubasi 15 menit, kemudian difiksasi dengan 100 $\mu$ l cytofix/cytoferm 10x dan diinkubasi kembali selama 20 menit. Setelah itu dicuci dengan 1ml wash buffer 10x . Supernatan dibuang dan ditambahkan 50-100 $\mu$ l wash buffer 10x, kemudian ditambah antibodi intraselular yang belum diencerkan sebanyak 1  $\mu$ l dan diinkubasi 15 menit sebelum dibaca di *Flow cytometri*.

## VI. Pertimbangan etik penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai subyek penelitian, maka perlu dimintakan persetujuan etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

## VII. HASIL PENELITIAN

### A. Tosisitas akut (LD<sub>50</sub>) oral

- a. Hasil penelitian LD<sub>50</sub> oral, ramuan ekstrak etanol rumput mutiara menunjukkan pada dosis 17885 mg/kg bb, tidak terjadi kematian pada hewan coba, sehingga LD<sub>50</sub> semu untuk ekstrak alkohol rumput mutiara adalah lebih besar dari 17885 mg/kg bb.
- b. Hasil penelitian LD<sub>50</sub> oral, ramuan ekstrak etanol rumput meniran menunjukkan pada dosis 13501 mg/kg bb, tidak terjadi kematian pada hewan coba, sehingga LD<sub>50</sub> semu untuk ekstrak alkohol meniran adalah lebih besar dari 13501 mg/kg bb.
- c. Hasil penelitian LD<sub>50</sub> oral, kombinasi ekstrak etanol rumput mutiara dan meniran menunjukkan pada dosis 13501 mg/kg bb, sehingga LD<sub>50</sub> semu untuk kombinasi ekstrak etanol meniran dan rumput mutiara adalah lebih besar dari 13501 mg/g bb.

Pengamatan selama 6 jam setelah pemberian bahan obat terhadap tingkah laku tingkah laku meliputi: tingkah laku (aktivitas spontan, peka sentuhan, rasa nyeri) dan eksitasi sistem syaraf pusat (gejala strarub, melompat, tremor, konvulsi) pada pemberian dosis besar pada semua ramuan hewan dalam keadaan normal yaitu peka terhadap sentuhan dan rasa nyeri. Tidak terjadi straub, melompat, tremor dan konvulsi pada hewan coba.

### Pengukuran bobot badan

Pengaruh pemberian bahan uji *single dose* (dosis sekali pemberian) terhadap bobot badan tikus jantan betina, dilakukan penimbangan hewan setiap hari, selama 14 hari pengamatan. Hasil penimbangan bobot badan, rata-rata terlihat kenaikan sampai akhir pengamatan. (Tabel 1)

Tabel 1. Rata-rata pertambahan bobot badan tikus pada uji toksisitas ekstrak etanol 70% rumput mutiara

Kelompok Dosis	Tikus	Hari ke-					
		1	2	7	9	11	14
Kelompok 1	jantan	164,0	167,4	168,0	171,0	174,8	178,0
17885 mg / kg bb	betina	152,6	153,0	158,4	165,0	167,6	171,6
Kelompok 2	jantan	152,6	153,0	158,4	165,0	167,6	171,6
12751 mg / kg bb	betina	155,4	159,2	159,4	169,0	170,4	173,0
Kelompok 3	jantan	160,4	169,4	177,8	185,2	190,8	196,0
9106 mg / kg bb	betina	152,0	150,8	157,2	161,2	164,4	168,0
Kelompok 4	jantan	157,9	161,5	166,3	172,6	176,1	180,6
6506 mg / kg bb	betina	152,4	155,6	158,8	162,2	165,4	168,2
Kelompok 5	jantan	163,0	167,8	174,0	180,0	186,6	195,0
4646,5 mg /kg bb	betina	157,7	161,0	165,6	171,3	175,0	179,7
Kelompok 6	jantan	158,1	161,4	165,8	172,8	175,0	179,7
3318,9 mg / kg bb	betina	152,8	154,6	157,0	160,0	162,8	164,6
Kelompok 7	jantan	163,6	164,8	168,0	170,8	174,0	177,4
2797 mg / kg bb	betina	151,8	153,8	156,2	158,6	161,4	164,8
Kelompok 8	jantan	162,8	165,2	167,8	171,0	174,4	177,8
2152 mg / kg bb	betina	154,2	156,4	159,0	160,8	164,0	166,8

Tabel 2. Rata-rata pertambahan bobot badan tikus pada uji toksisitas ekstrak etanol 70% meniran

Kelompok Dosis	Tikus	Hari ke-					
		1,0	2,0	7,0	9,0	11,0	14,0
Kelompok 1	jantan	169,0	164,8	173,2	176,4	183,0	191,4
13501 mg / kg bb	betina	108,1	107,7	113,1	115,4	119,3	124,1
Kelompok 2	jantan	180,8	172,0	180,2	189,4	194,4	199,0
12751 mg / kg bb	betina	151,8	150,0	153,6	158,2	162,8	165,2
Kelompok 3	jantan	171,2	168,0	173,2	179,0	186,8	191,4
9106 mg / kg bb	betina	167,9	163,3	169,0	175,5	181,3	185,2
Kelompok 4	jantan	166,0	161,4	165,2	168,0	177,8	183,0
6506 mg / kg bb	betina	154,2	153,4	155,4	159,2	161,2	165,0
Kelompok 5	jantan	162,7	159,4	163,2	167,6	173,4	177,7
4646,5 mg /kg bb	betina	161,0	158,1	161,3	164,9	170,8	175,2
Kelompok 6	jantan	165,8	163,6	166,4	169,4	173,4	178,6
3318,9 mg / kg bb	betina	155,4	154,6	159,4	160,0	162,8	166,6
Kelompok 7	jantan	166,2	163,6	167,2	171,0	177,0	180,0
2797 mg / kg bb	betina	162,5	160,6	164,3	166,8	171,1	175,1
Kelompok 8	jantan	165,0	166,0	168,6	170,8	174,4	179,0
2152 mg / kg bb	betina	164,6	163,4	166,7	169,5	174,2	178,0

Tabel 3. Rata-rata pertambahan bobot badan tikus pada uji toksisitas ekstrak etanol 70% herba rumput mutiara (2 bagian) dan meniran (1 bagian ). Perbandingan 2 : 1

Kelompok	Tikus	Hari ke-					
		1,0	2,0	7,0	9,0	11,0	14,0
Kelompok 1	jantan	163	150	150	155	160	165
13501 mg / kg							
bb	betina	156,0	151,0	146,6	147,4	149,0	153,0
Kelompok 2	jantan	166,4	151,0	124,8	161,8	166,6	174,0
12751 mg / kg							
bb	betina	152,4	149,8	158,4	163,6	170,4	174,2
Kelompok 3	jantan	165,6	154,4	154,4	167,2	171,0	180,0
9106 mg / kg							
bb	betina	159,6	151,0	151,0	151,0	154,4	161,0
Kelompok 4	jantan	159,8	170,6	182,0	185,0	186,0	188,8
6506 mg / kg							
bb	betina	156,0	148,6	153,8	158,4	164,0	168,6
Kelompok 5	jantan	169,2	173,4	179,6	184,4	187,6	191,8
4646,5 mg /kg							
bb	betina	156,4	155,4	161,0	165,6	167,8	172,4
Kelompok 6	jantan	164,4	169,4	174,6	179,0	181,8	184,6
3318,9 mg / kg							
bb	betina	164,4	169,2	173,0	176,8	182,0	184,8
Kelompok 7	jantan	160,0	161,8	164,8	167,5	169,0	172,5
2797 mg / kg							
bb	betina	189,0	177,0	179,3	182,5	185,8	190,0
Kelompok 8	jantan	150,0	155,0	157,0	160,0	163,0	165,0
2152 mg / kg							
bb	betina	155,4	156,6	160,8	163,4	165,8	168,6

## B. Karakterisasi ekstrak

### 1. Ekstraksi Meniran dan Rumput Mutiara

#### Rendemen ekstrak

Rendemen ekstrak ditimbang berdasarkan berat akhir setelah ekstraksi selesai dilakukan, dibandingkan terhadap jumlah simplisia yang digunakan pada saat ekstraksi. Pada setiap berat simplisia meniran 2000 gram diekstrak dengan menggunakan etanol 70%, didapatkan ekstrak meniran 160,80 gram, sehingga diperoleh rendemen meniran 8,04 %. Sedangkan 2000 g simplisia rumput mutiara setelah diekstrak dengan etanol 70% diperoleh ekstrak rumput mutiara 300,40 g, sehingga rendemen rumput mutiara sebesar 15,02%

### 2. Karakterisasi kimia ekstrak

Karakteristik ekstrak meniran dan rumput mutiara yang meliputi pemeriksaan: kadar air, susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut dalam etanol dan kadar sari larut dalam air dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik non spesifik ekstrak meniran dan rumput mutiara

No	Karakteristik	Persentase ekstrak	
		Meniran	Rumput mutiara
1	Kadar air	3,07	9,90
2	Susut pengeringan	9,50	21,65
3	Kadar abu total	3,32	17,05
4	Kadar abu larut asam	0,77	0,89
5	Kadar sari larut dalam etanol	4,48	6,14
6	Kadar sari larut dalam air	68,55	72,74

### 3. Penapisan Fitokimia

Pada simplisia dari meniran dan rumput mutiara dilakukan penapisan fitokimia, diperoleh hasil seperti pada tabel 5.

Tabel 5. Penapisan fitokimia meniran dan rumput mutiara

No	Penapisan	Meniran	Rumput mutiara
1.	Tanin	+	+
2.	Saponin	-	-
3.	Steroid	-	+
4.	Triterpenoid	+	-
5.	Flavanoid	+	+

### 4. Penetapan kadar

Tabel 6. Penetapan kadar phyllantin dan asam ursolat yang terkandung dalam ekstrak.

No	Zat aktif	Area	Sampel	Area	Kadar zat aktif dalam %
1.	Phyllantin	3346	Ekstrak meniran	805,2	0,864
2.	Asam ursolat	4808,6	Ekstrak rumput mutiara	506,1	0,287

## B. UJI IN VIVO

### 1. Hasil analisis respon imun sel limpa mencit C3H secara in vivo.

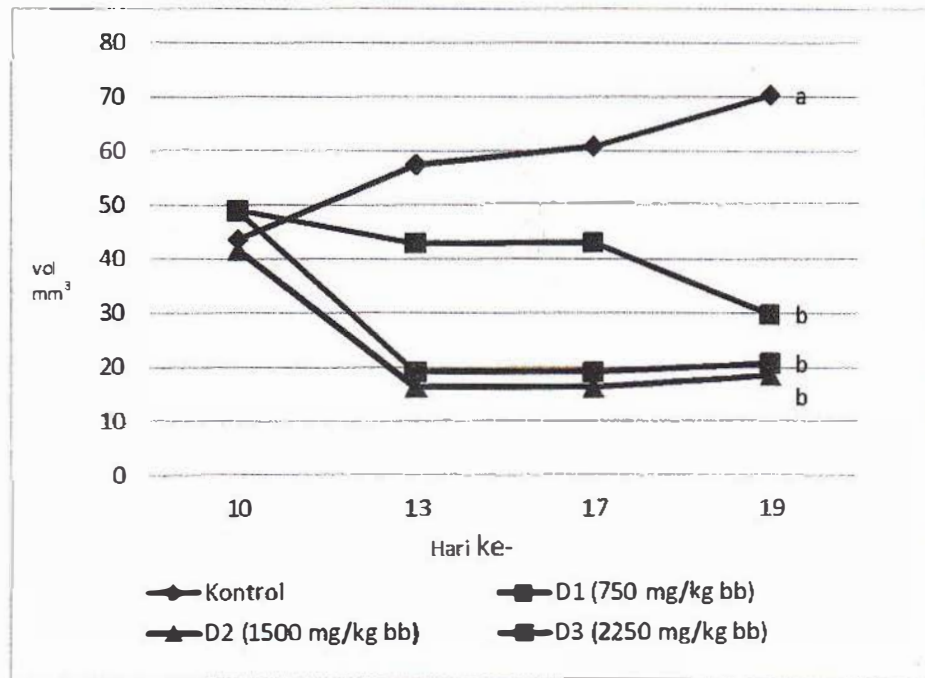
Tabel 7. Hasil analisis suspensi limpa mencit bertumor pada uji in vivo

Kelompok Pengukuran	Kontrol	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Jml limfosit ( $\times 10^6$ sel/ml)	114,8 $\pm$ 12,77 a	168,4 $\pm$ 15,19 ab	240 $\pm$ 24,85 bc	262 $\pm$ 31,14 c
Berat limpa (mg)	60 $\pm$ 12,24 a	58 $\pm$ 10,95 a	74 $\pm$ 11,40 a	70 $\pm$ 12,24 a
Berat Tumor	242 $\pm$ 48,6 ab	164 $\pm$ 32,09 a	280 $\pm$ 71,7 b	322 $\pm$ 93,3 b
Volume Tumor	360 $\pm$ 89,4 ab	280 $\pm$ 44,72 a	340 $\pm$ 54,77 ab	420 $\pm$ 83,66 b
Jumlah Relatif CD4 (%)	19,7 $\pm$ 1,75 a	19,36 $\pm$ 1,11 a	18,82 $\pm$ 1,26 a	19,3 $\pm$ 2,87 a
Jumlah Relatif CD8 (%)	11,7 $\pm$ 1,71 a	12,7 $\pm$ 1,74 a	11,66 $\pm$ 1,49 a	11,39 $\pm$ 1,15 a
Jumlah relatif CD 64 (%)	1,58 $\pm 0,44$ a	1,64 $\pm 0,16$ ab	2,13 $\pm$ 0,87 ab	2,34 $\pm$ 0,24 bc
Jumlah relatif CD4 <sup>+</sup> CD25 (%)	10,92 $\pm$ 2,53 a	10,90 $\pm$ 0,85 a	10,25 $\pm$ 1,99 a	12,26 $\pm$ 2,67 a
Jumlah relatif CD64 <sup>+</sup> CD54 (ICAM)(%)	22,22 $\pm 1,588$ a	21,82 $\pm 1,15$ a	46,68 $\pm$ 18,08 b	45,22 $\pm$ 17,54 b
Jumlah relatif CD64 <sup>+</sup> CD106 (VCAM)(%)	10,56 $\pm 1,62$ a	12,35 $\pm 3,99$ a	28,04 $\pm 8,75$ b	27,92 $\pm 10,75$ b
Jumlah relatif CD4 yang mengekspresikan IL2 (%)	1,1 $\pm$ 0,24 a	1,3 $\pm$ 0,42 a	2,03 $\pm$ 0,32 b	2,0 $\pm$ 0,68 b

*Keterangan :huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata (p>0,05)*

2. Hasil pengukuran pertumbuhan tumor mencit mulai hari ke-10 hingga hari ke-19 setelah transplantasi tumor.

Grafik 1. Pengukuran pertumbuhan tumor



3. Hasil skor AgNOR preparat histopatologi tumor mencit C3H.

Tabel 8. Hasil histopatologi dengan pewarnaan AgNOR

Kelompok Pengukuran	Kontrol	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Skor AgNOR	1,442 ±0,1 a	1,421 ±0,2 a	1,338 ±0,1 a	1,299 ±0,1 b

Keterangan :huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata ( $p>0,05$ )

4. Uji in vitro

Sampai dengan dibuatnya laporan akhir ini, uji in vitro belum memberikan hasil, dikarenakan sedang dalam proses optimasi metode.

## VIII. Keterbatasan penelitian

Telah terjadi perubahan pada metodologi dalam hal:

- Hanya menggunakan mencit strain C3H saja, tidak menggunakan mencit strain GR.

Dalam penelitian ini seharusnya digunakan 2 strain mencit bertumor, yaitu GR dan C3H, perbedaan keduanya yaitu dalam tumorigenesis, C3H tidak bergantung pada hormon sedang GR bergantung pada hormon. Tidak digunakannya mencit strain GR pada penelitian ini, dikarenakan strain tersebut persediannya sudah tidak dapat dipastikan lagi, dikarenakan kualitasnya sudah menurun. (Penyedia mencit GR dan C3H satu-satunya di Indonesia adalah bag. Patologi FKUI). Seharusnya pada tujuan khusus, tercantum kata-kata 'membandingkan'. Contoh: Mengukur dan membandingkan aktivitas makrofag pada mencit C3H dan GR yang diberi kombinasi meniran dan rumput mutiara. Dengan tidak digunakannya mencit GR pada penelitian ini berakibat tidak didapatkannya data mencit GR. Dengan demikian pada penelitian ini hanya dilakukan kegiatan pengukuran tanpa membandingkan.

- Tidak menggunakan kontrol positif dalam uji in vivo.

Hal ini dikarenakan mencit yang diperoleh dari bag Patologi UI hanya 24 ekor, dan yang memenuhi kriteria inklusi hanya 20 ekor, sehingga hanya dikelompokkan ke dalam 4 kelompok perlakuan @ 5 ekor, yaitu: 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok variasi dosis. Seharusnya ada satu kelompok kontrol positif cisplatin. Namun demikian, banyak jurnal dan artikel pengujian obat tradisional yang hanya membandingkan dengan kontrol negatif saja.

## IX. Pembahasan

Kombinasi ekstrak etanol meniran dan rumput sampai dengan dosis 13501 mg/g BB tikus, dinyatakan aman setara dengan 2700 mg/200g BB tikus. Sedangkan dosis yang terbesar yang digunakan pada penelitian ini adalah 2250 mg/kg BB mencit setara dengan 315 mg/200g BB tikus. Dengan demikian dosis ekstrak RMM yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis yang aman. Data bobot badan, asupan makanan dan minuman serta gejala-gelajala klinis digunakan untuk mengevaluasi status kesehatan dan perkembangan patologi

hewan percobaan akibat sediaan bahan uji. Hasil penimbangan bobot badan pada semua ramuan rata-rata menunjukkan kenaikan bobot badan sampai akhir percobaan. Hingga akhir pengamatan pemberian dosis besar pada semua ramuan hewan dalam keadaan normal tidak terjadi gejala klinis straub, melompat, tremor dan konvulsi pada hewan coba. Hal tersebut menunjukkan indikasi bahan obat tidak menyebabkan kelainan pada sistem saraf pusat, saraf motorik, maupun kelainan fisik, sehingga metabolisme tubuh tidak banyak mengalami gangguan.

Hasil karakterisasi kimia terhadap parameter standar umum ekstrak rumput mutiara dan meniran terdapat pada tabel 4. Kadar air rumput mutiara dan meniran, keduanya masih di bawah 10%, ini berarti kecil kemungkinan ekstrak untuk ditumbuhi jamur. Susut pengeringan identik dengan kadar air, dimana susut pengeringan menggambarkan kandungan air ekstrak karena pengaruh udara terbuka. Pada ekstrak meniran dan rumput mutiara, didapatkan data susut pengeringan lebih besar daripada kadar air. Hal ini berarti selain air, minyak atsiri yang terkandung juga ikut menguap pada 105°C. Kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam menggambarkan kandungan mineral dalam ekstrak. Pada penetapan kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam, pemanasan ekstrak pada suhu 700 °C, mengakibatkan senyawa organik menguap sehingga menyisakan senyawa mineral dan senyawa anorganik saja. Kadar abu total menunjukkan sisa senyawa anorganik dalam ekstrak, sedangkan kadar abu larut asam menunjukkan kandungan unsur anorganik yang tidak larut asam. Analisis parameter standar umum ekstrak dimaksudkan agar dapat menjamin bahwa produk ekstrak mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan.

Analisis fitokimia terhadap kedua jenis simplisia, didapatkan kandungan tanin, triterpen, flavonoid dan alkaloid pada simplisia meniran. Sedangkan kandungan tanin, steroid dan flavonoid terdapat pada simplisia rumput mutiara. Kandungan flavonoid pada tumbuhan berperan pada aktivitas imunostimulator dan antitumor. Analisis kadar zat aktif secara

densitometry, menyatakan bahwa ekstrak meniran mengandung 0,858% phyllantin. Sedangkan rumput mutiara mengandung 0,287 asam ursolat.

Uji *in vivo* pada mencit C3H bertumor, dilakukan pemberian bahan uji kombinasi ekstrak rumput mutiara dan meniran (RMM) mulai hari ke 10 setelah transplantasi tumor, setiap hari selama 19 hari. Pengukuran tumor dilakukan 3 hari sekali. Hasil pengukuran pertumbuhan tumor pada hari ke 10 sampai hari ke 19 setelah transplantasi terdapat pada grafik 1. Grafik 1 menunjukkan bahwa pada hari 19 atau 9 hari setelah pemberian bahan uji, ekstrak RMM dapat menurunkan volume tumor secara bermakna pada semua tingkatan dosis dibanding kontrol. Hal ini menggambarkan bahwa ekstrak RMM dapat menghambat pertumbuhan tumor. Adapun hasil pengukuran terhadap berat dan volume tumor pada mencit C3H yang diberi ekstrak RMM pada akhir uji yaitu hari ke 29 atau setelah 19 hari diberi bahan uji, sebagaimana yang tercantum pada tabel 7, terlihat bahwa pemberian ekstrak RMM dosis 2250 mg/kg bb menghasilkan volume tumor terbesar. Hal ini dimungkinkan karena adanya infiltrasi sel-sel mononuklear yang berfungsi untuk melisis sel tumor pada jaringan tumor dan akan memberikan prognosis baik. Infiltrasi sel-sel mononuklear pada jaringan tumor dapat dilihat dengan preparat histopatologi tumor dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE), yang belum dilakukan pada penelitian ini.

Hasil analisis respon imun terhadap suspensi limpa mencit secara *flow cytometri* terdapat pada Tabel 7. Tabel 7. menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna pada jumlah relatif sub populasi limfosit T CD4, CD8 dan CD25. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat gangguan homeostasis. Pada analisa CD64 (makrofag), dan CD54 (ICAM) serta CD106 (VCAM) terdapat perbedaan bermakna pada jumlah relatif makrofag, ICAM dan VCAM pada mencit C3H yang diberi ekstrak RMM dosis 2250 mg/kg bb dibandingkan kontrol. Hal ini sesuai dengan harapan bahwa pemberian ekstrak RMM dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas makrofag sehingga dapat melisis sel tumor sesuai perannya dalam imunosurveilans.

Jumlah relatif sel T CD4 yang mengekspresikan IL2 meningkat secara bermakna pada kelompok RMM dosis 3 dan 4 (1500;2250 mg/kg BB) dibanding kelompok dosis 1 dan kelompok kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa sel T CD4 teraktifasi menjadi sel Th1 dan memproduksi IL2. IL2 menginduksi sel TCD8 untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel CTL (sitotoksik) yang akhirnya dapat melisis sel tumor. Selain itu, sel Th1 juga menghasilkan IFN $\gamma$ , yang dapat mengaktifasi makrofag untuk menghasilkan sitokin-sitokin yang dapat mengaktifasi sel NK. Sel NK, sel T CD8 dan makrofag berperan dalam imunosurveilans tumor.<sup>(21,22,23)</sup>

Hasil pengamatan secara mikroskopik terhadap preparat histopatologi dengan pewarnaan AgNOR menunjukkan skor AgNOR (jumlah noktah Ag pada setiap 200 sel yang positif menyerap Ag) terendah pada kelompok mencit dosis 2250 mg/kg BB bermakna dibanding kontrol. Teknik pewarnaan AgNOR sangat baik dalam mengenali kehadiran antigen dalam inti sel pada semua siklus kecuali G-0, sehingga teknik ini dapat digunakan untuk menentukan aktivitas proliferasi sel.

Dari hasil penelitian secara keseluruhan didapatkan hasil bahwa dosis ekstrak RMM yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis yang aman. Rumput mutiara dan meniran mengandung senyawa flavonoid yang berperan sebagai imunostimulatur dan antitumor. Pemberian ekstrak RMM pada dosis 2250 mg/kg BB selama 19 hari, dapat menurunkan volume tumor, tidak mempengaruhi homeostasis, meningkatkan jumlah dan aktifitas makrofag, meningkatkan jumlah IL2 yang berdampak pada peningkatan aktivitas CD8 sitotoksik dan menurunkan proliferasi sel-sel tumor pada mencit C3H bertumor. Hal ini memenuhi harapan bahwa pemberian ekstrak RMM dapat mendukung imunosurveilans mencit bertumor.

## **X. KESIMPULAN**

1. Kombinasi ekstrak alkohol meniran dan rumput mutiara sampai dengan dosis 13501 mg/kg bb tikus dinyatakan aman.
2. Meniran mengandung tanin, triterpen, flavonoid dan alkaloid. Sedangkan rumput mutiara mengandung tanin, steroid.
3. Jumlah relatif sel T CD4, CD8, CD25 pada mencit C3H yang diberi kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak rumput mutiara tidak berbeda bermakna dengan kontrol pada semua dosis.
4. Kombinasi ekstrak rumput mutiara dan meniran dosis 2250 mg/kg bb. dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan aktifitas sel CD8 sitotoksik pada mencit C3H, dengan meningkatnya ekspresi IL2 pada sel T CD4 secara bermakna dibanding kontrol.
5. Kombinasi ekstrak rumput mutiara dan meniran dosis 2250 mg/kg bb. dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas makrofag (ICAM, VCAM) pada mencit C3H, secara bermakna dibanding kontrol.
6. Kombinasi ekstrak rumput mutiara dan meniran dosis 750; 1500; 2250 mg/kg bb. dapat menurunkan pertumbuhan volume tumor pada mencit C3H.
7. Kombinasi ekstrak rumput mutiara dan meniran dosis 2250 mg/kg bb. dapat menurunkan proliferasi sel tumor pada mencit C3H secara bermakna dibanding kontrol.

## **XI. Saran**

Untuk penelitian selanjutnya, pada uji in vivo agar dilanjutkan analisa ekspresi IFN  $\gamma$  dan CD62L pada sel T CD4 serta ekspresi IFN  $\gamma$  dan TNF $\alpha$  pada makrofag. Sedang pada uji in vitro dilakukan uji analisa siklus sel. Juga dilakukan pewarnaan dengan anti VEGF pada preparat histopatologi untuk melihat potensi antiangiogenesis.

## XII. Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih kami tujukan kepada Kepala Badan Litbang Kesehatan, dan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah memfasilitasi berlangsungnya penelitian dengan dan DIPA th 2012. Ucapan terimakasih juga kami tujukan kepada Bapak Muhaimin Rifa'i, Med. Sc., PHd. dari Universitas Brawijaya atas konsultasi analisa *flowcytometri* serta Lab. Imunologi dan Lab. Stem cell PBTDK atas dukungan fasilitas penelitian.

## XIII. Daftar Pustaka

1. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1060>. diakses 11 Juli 2011. Pk 5.02.
2. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. *Cellular and molecular immunology*. WB Saunders Company: Philadelphia. 1991.
3. Ise W., M. Totsuka, Y. Sogawa, A.Ametani, S. Hachimura T. Sato, Y.Kumagai, S. Habu, and S.Kaminogawa. *Naive CD4+ T Cells Exhibit Distinct Expression Patterns of Cytokines and Cell Surface Molecules on Their Primary Responses to Varying Doses of Antigen*. J. Immunol., April 1, 2002; 168 (7): 3242-3250.
4. Karimi M., T. M. Cao, J. A. Baker, M. R. Verneris, L. Soares, and R. S. Negrin. *Silencing Human NKG2D, DAP10, and DAP12 Reduces Cytotoxicity of Activated CD8+ T Cells and NK Cells*. J. Immunol 2005; 175 (12): 7819-7828.
5. Slifka MK, Pagarigan RR, Whitton JR. *NK markers are expressed on a high percentage of virus specific CD8+ and CD4+ T cells*. J Immunol. 2000; 164: 2009-2015.
6. Gusmeta Amelia.2006. *Potensi Rumput Mutiara (Hedyotis corymbosa (L.) Lam Sebagai Antioksidan Alami*. Prog.Studi Biokimia, FMIPA IPB
7. Ulfia mutiara. *Ekstrak Etanolik Hedyotis corymbosa (L.) menurunkan proliferasi sel pada kelenjar payudara tikus melalui penekanan ekspresi C-Myc*. Fakultas Farmasi UGM.

8. Dyani P. Sukamdi,dkk. 2008. *Potensi antiproliferasi ekstrak etanolik Hedyotis corymbosa (L.) Lamk. terhadap sel hepar tikus terinduksi 7,12-dimetil benz(a)antrazena*. Cancer hemoprevention Research Center (CCRC), Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
9. Rivai Harrisul, dkk. 2009. *Effect of Etanol-Water Ratio of Extraction Solvent Towards the Quality of Meniran Herb Extract (Phyllanthus niruri Linn)*. Fakultas Farmasi. Universitas Andalas Padang
10. Galuh A. S. , Banundari Rachmawati. 2008. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Phyllanthus Niruri L Terhadap Fungsi Fagositosis Makrofag pada Mencit Balb/C yang Diinfeksi Salmonella Typhimurium*. Fakultas Kedokteran Diponegoro Semarang.
11. Nugroho, Trulaksana, 2003. *Pengaruh Pemaparan Kombinasi Ekstrak Meniran (Phyllanthus niruri L.) dan ekstrak Sirih (Piper Betle Linn.) Terhadap Viabilitas Sel Tumor Adenocarcinoma Mamae Mencit C3H secara In Vitro*. Thesis Program Pasca Sarjana UNDIP.
12. Sau Har Lee, et al. 2011. *Antimetastatic Effects of Phyllanthus on Human Lung (A549) and Breast (MCF-7) Cancer Cell Lines*. Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Universiti Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.
13. Budwan, Susan. *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemical Drug Biological*. Publish by Merck Co & USA; 260. 1989.
14. Shibata M, et al. *Comparative Effect of Lovastatin on Mammary and Prostate Oncogenesis in Transgenic Mouse Models*. Carcinogenesis 2003; 24: 453-9.).
15. Shryock H. *Penuntun Perawatan dan Pengobatan Modern*. Diterjemahkan oleh Hutapea AR. Bandung: Indonesia Publishing House; 1981. hal: 347-348.
16. Morgan SJ, Darling DC. *Animal Cell Culture*. United Kingdom: BIOS scientific Publishers Limited; 1993. hal: 1-2, 27-36.
17. Madden. R.E., Burk D. *Production of viable single cell suspensions from solid tumors*. JNCI, 1991;27: 841-861.

18. Grimm E., Loudon W. *The generation and quantitation of cell-mediated cytotoxicity*. Dalam: Balkwill F.R. (ed.). *Cytokines*. IRL press. Oxford 1995: 197-212.
19. Platts K.E. *Ex vivo activation of effector cells*. (dalam) Gallagher G., Rees R.C., Reynolds C.W. (eds.). *Tumor immunobiology: a practical approach*. IRL Press: Oxford. 1993.
20. Anonim, 2000. *Parameter umum standar ekstrak tumbuhan obat, Edisi I*, Dirjen POM, Depkes RI.
21. Wang, G. 2007. *Enhancement of IL2 and IFN  $\gamma$  expression and NK cells activity involved in the antitumor effect of ganoderic acid Me in vivo*. *International Immunopharmacology* 7 p:864-870
22. Khalid MS., 2010. *Anti-tumor Activity of Agaricus bisporus extracts and its relation with IL2 in Tumor Bearing Mice*. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetic*. Vol 3. No 2.
23. Nugroho, T., 2003. *Pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran (Phyllanthus niruri L) dan sirih (Pepper betle L.) terhadap viabilitas sel tumor adenocarcinoma mammae mencit C3H secara in vitro*. Thesis Magister Ilmu Biomedik. PPS UNDIP.

A. SUSUNAN TIM PENELITI

Nama		NIP / Gol	Tugas
Tri Wahyuni L, S. Farm	Peneliti	197705292000032001/ IIIa	Mengikuti jalannya penelitian dari awal hingga akhir Penanggung jawab penulisan laporan
drh. Wien Winarno, MKes	Peneliti	195903181990032001/ IVb	Melakukan uji imunomodulator invivo, membantu peneliti mengerjakan penelitian dari awal sampai akhir
Drs. Kusmardi, MS	Peneliti	196503271990031001/ III d	Melakukan uji imunomodulator in vitro
Dra. Yun Astuti, Mkes	Peneliti	195506281983022001/IVa	Melakukan uji imunomodulator in vivo
Budi Nuratmi, BSc	Peneliti	1956093019840321001/IVa	Melakukan uji toksisitas
Dra. Dian Sundari	Peneliti	196306071991012001/ IVa	Melakukan uji toksisitas
drh. Putri Reno Intan	Peneliti	198405102010122002/ IIIb	Melakukan operasi, membantu peneliti mengerjakan penelitian dari awal sampai akhir
Dra. Sukmayati Alegantina	Peneliti	196507231994032003/ III d	Melakukan karakterisasi ekstrak
Rulina Novianti, S.Si	Peneliti	197011021998032001/IIIa	Melakukan pekerjaan flowcytometri
Sahrui	Pembantu Lapangan		Membantu peneliti dalam penelitian invivo.
Misbah	Pembantu Lapangan		Membantu peneliti dalam penelitian invivo.
Sugianto. SKM	Sekretariat Penelitian		Membantu administrasi

B. BIODATA KETUA PELAKSANA

a. Nama Pengusaul (Lengkap dengan gelar kesarjanaan dan keahlian) Tri Wahyuni Lestari, S.Farm
b. Alamat (yang paling mudah dihubungi lewat pos, telepon, fax dane-mail) Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta Telepon 4261088 Ps.180 e-mail : <a href="mailto:wahyuni_lestari29@yahoo.com">wahyuni_lestari29@yahoo.com</a>
c. Pendidikan Profesional (gelar akademis, nama instansi/lembaga dan tempat serta Waktu/tanggal tahun diperoleh Sarjana Farmasi Univ Indonesia 2007
d. Riwayat Pekerjaan Peneliti Pertama



**KEMENTERIAN KESEHATAN RI**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN**

Jalan Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560  
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012

Telepon (021) 42881758, 42881763, 42881762, 42881745  
Fax (021) 42881754

**Lampiran 1**  
**Keputusan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar**  
**Kesehatan**  
Nomor : HK.03.05/III/750/2012  
Tanggal : 6 Februari 2012

**SUSUNAN TIM PELAKSANA PENELITIAN TAHUN 2012**  
**EFEK ANTI TUMOR KOMBINASI RUMPUT MUTIARA (*HEDYOTHIS CORYMBOSA LAMK*)**  
**DAN *PHYLANTHUS NIRURI* TERHADAP SUB POPULASI LIMFOSIT DAN**  
**MAKROFAG MENCIT BERTUMOR MAMAE**

1. Tri Wahyuni L, S.Fam : Peneliti Pertama/Ketua Pelaksana
2. drh. M. Wien Winamo, M.Kes : Peneliti Madya
3. Dra. Yun Astuti, M.Kes : Peneliti Madya
4. Budi Nuratni, B.Sc : Peneliti Madya
5. Dra. Dian Sundar : Peneliti Madya
6. Dra. Suknayani Aiegantina : Peneliti Muda
7. Drs. Kusmardi, MS : Peneliti Non Fungsional
8. drh. Putri Reno Intan : Peneliti Non Fungsional
9. Rulina Novianti, S.Si : Peneliti Non Fungsional
10. Sahrul : Pembantu Lapangan
11. Misbah : Pembantu Lapangan
12. Sugianto, S.Kom : Sekretariat Penelitian

X Kepala,

  
Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt  
NIP. 19621119 198803 100 1



**KEMENTERIAN KESEHATAN**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226  
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933  
E-mail: [sesban@litbang.depkes.go.id](mailto:sesban@litbang.depkes.go.id) Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

**PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)**

Nomor: KE.01.04/EC/281/2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol-penelitian yang berjudul :

**"Efek Anti Tumor Kombinasi Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa Lamk*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri L*) terhadap sub Populasi Limfosit dan Makrofag Mencit Bertumor Mammae"**

yang mengikutsertakan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

**Tri Wahyuni Lestari, S.Farm.**

dapat disetujui pelaksanaan ya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 13 April 2012

Ketua  
Komisi Etik Penelitian Kesehatan  
Badan Litbang Kesehatan.

  
Prof. Dr. M. Sudomo

Realisasi Anggaran Penelitian Tahun 2012

Judul penelitian : Efek Anti Tumor Kombinasi Ekstrak Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap sub populasi Limfosit T dan Makrofag Mencit Bertumor Mammae.

Ketua peneliti : Tri Wahyuni Lestari, S. Farm

Pagu penelitian : Rp. 432.163. 769,-

Realisasi Total (Rp.)	Uraian realisasi				
	Honor Tetap	Belanja Bahan	Perjadin	Belanja Non operasional	Belanja jasa profesi
415.552.162	74.180.000	288.650.000	27.520.000	25.200.000	11.200.000

Menyetujui

Kepala Bidang Biomed

Dr. Roselinda, M.Epid  
NIP 195807011987012001

Pengusul

Tri Wahyuni Lestari, S. Farm  
NIP. 197705292000032001

Disetujui

Ketua Panitia Pembina Ilmiah

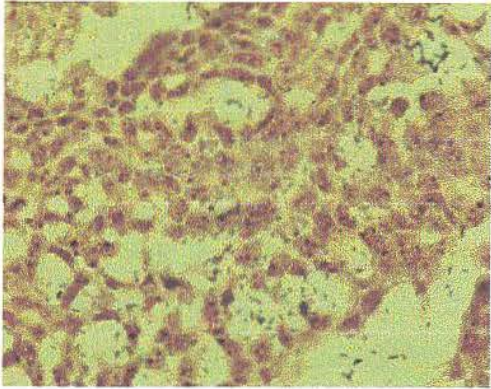
Dr. drg. Magdarina D. A, MSc  
NIP. 195012061984022001



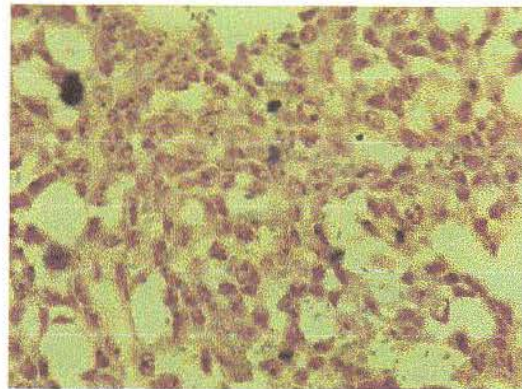
Kepala Pusat BTDK  
Drs. Ondri Dwi Sampurno, Msi, Apt  
NIP. 196211191988031001

**LAMPIRAN**

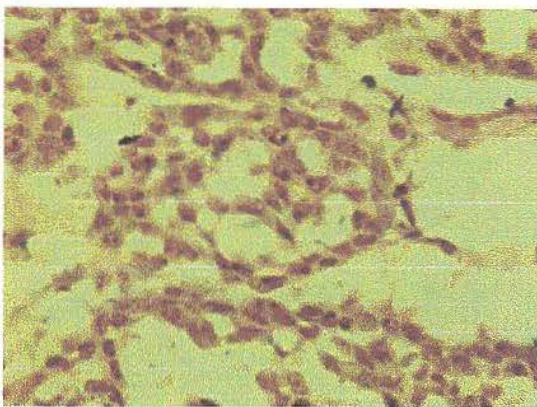
**Lampiran 1. Gambaran Histopatologi Pewarnaan AgNOR pada Kelompok Kontrol Kontrol 1**



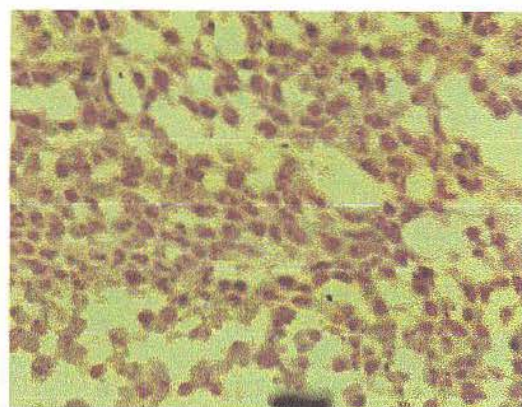
k1-1



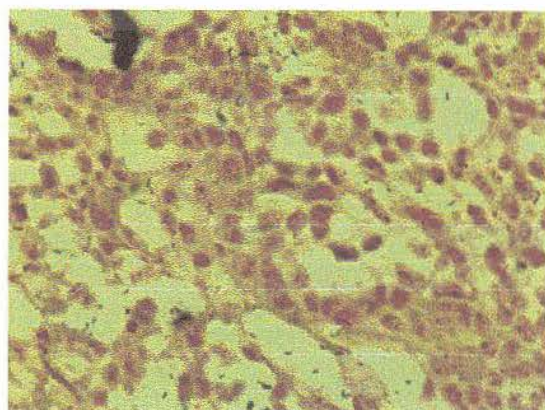
K1-2



K1-3



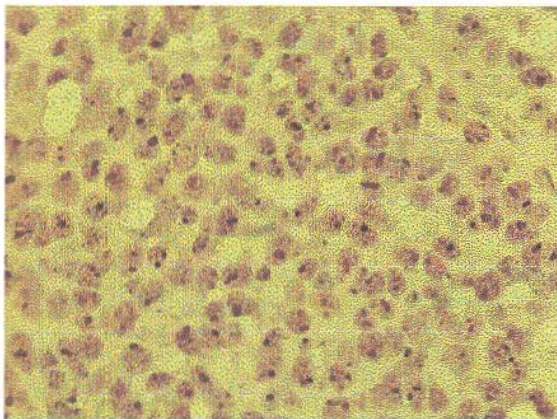
K1-4



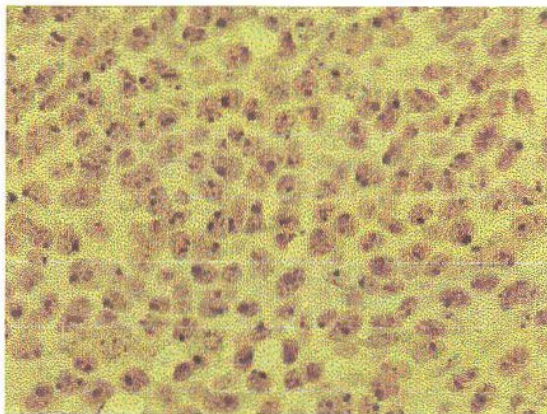
K1-5

Lampiran 2. Gambaran Histopatologi Pewarnaan AgNOR pada Kelompok Dosis 1 ( 750mg/kg bb )

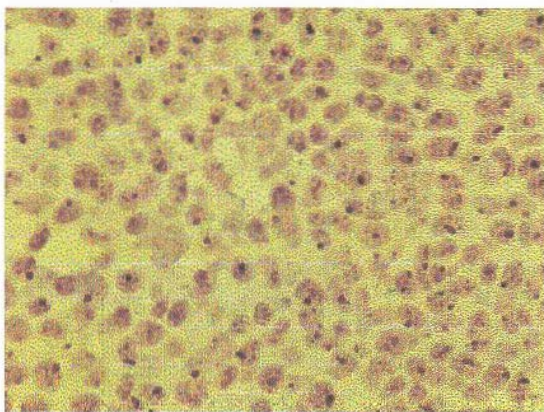
Dosis 1-4



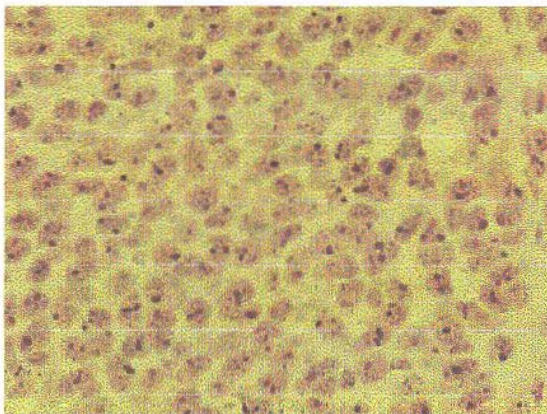
D1-4-1



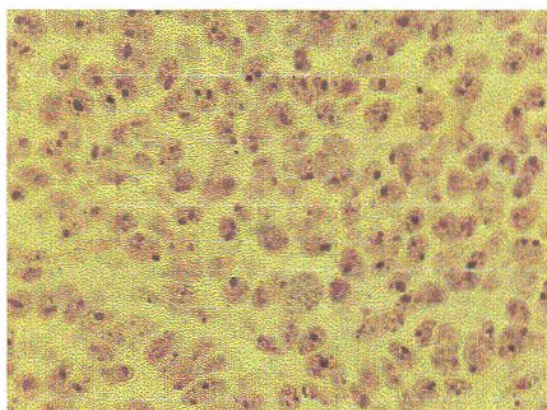
D1-4-2



D1-4-3



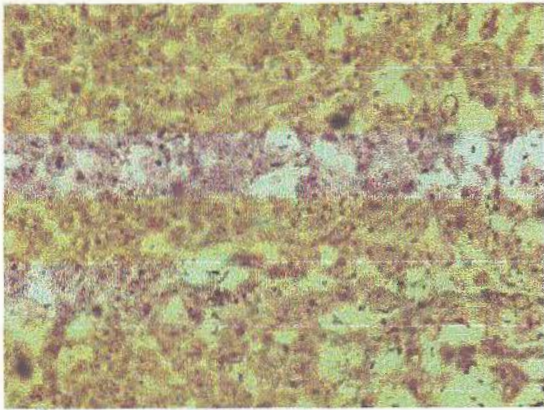
D1-4-4



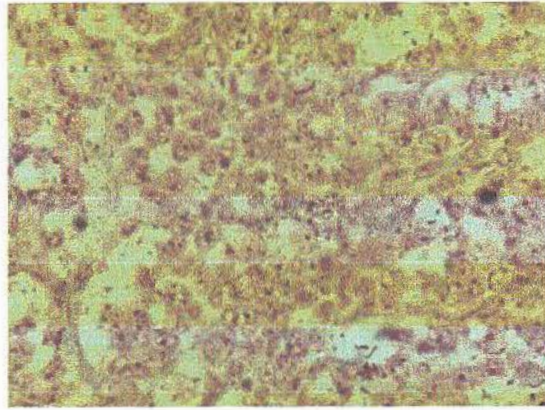
D1-4-5

Lampiran 3. Gambaran Histopatologi Pewarnaan AgNOR pada Kelompok Dosis 2 ( 1500 mg/kg bb )

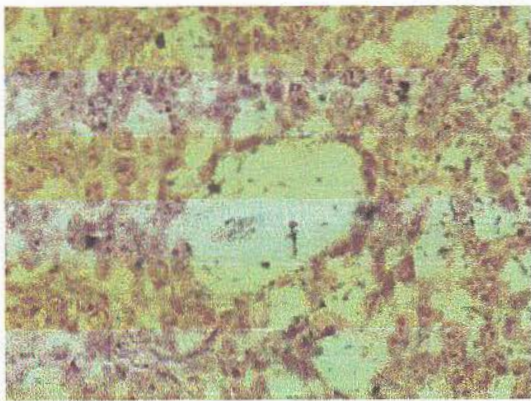
Dosis 2-5



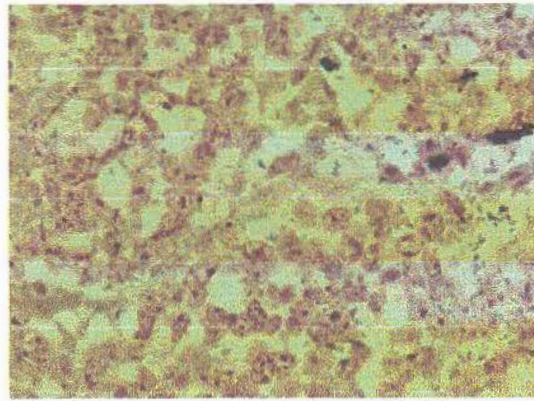
D2-5-1



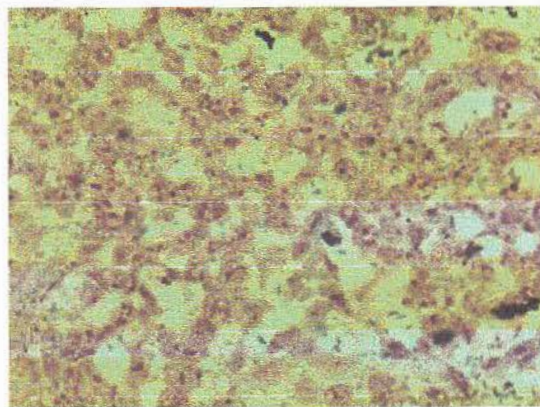
D2-5-2



D2-5-3

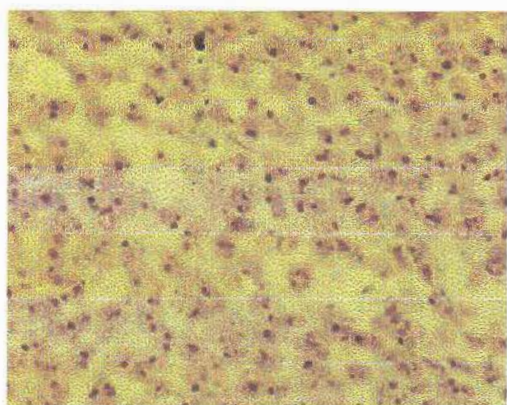


D2-5-4

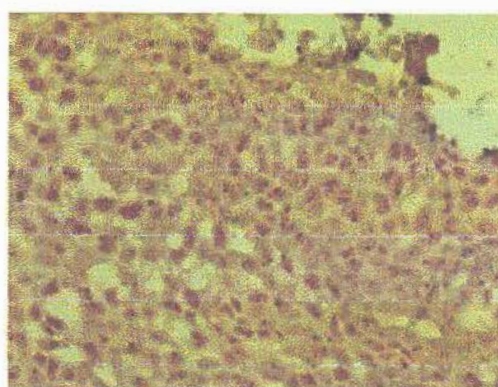


D2-5-5

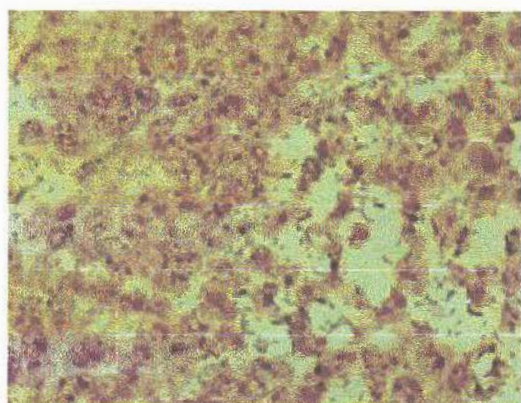
Lampiran 4. Pewarnaan AgNOR pada preparat histopatologi tumor menci t C3H (rangkuman)



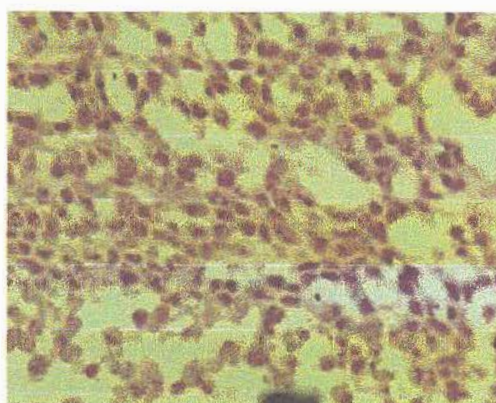
Kontrol



Dosis 750 mmg/kg bb



Dosis 1500 mmg/kg bb



Dosis 2250 mmg/kg bb

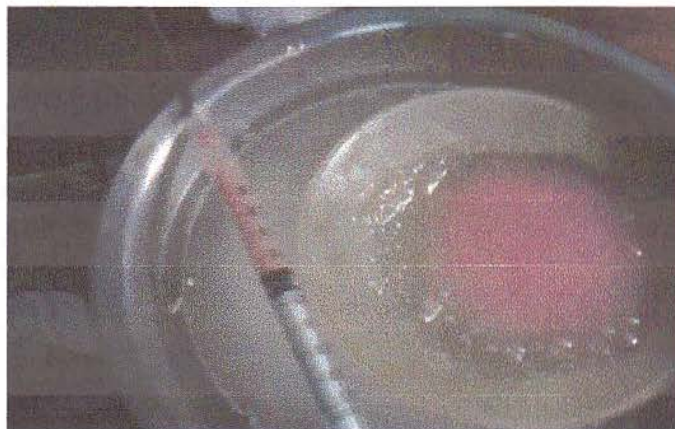
Lampiran 5. Penyiapan transplantasi tumor



Gambar tumor dari donor mencit



Gambar tumor dari mencit donor



Lampiran 6. Mencit perlakuan dan hasil tumor mencit



Gambar mencit perlakuan



Gambar tumor dari mencit perlakuan



Gambar penimbangan berat tumor

Lampiran 7. Penapisan Fitokimia pada pengujian tanin



Gambar Pengujian tanin pada Meniran ( positif tanin, warna hitam kehijauan )

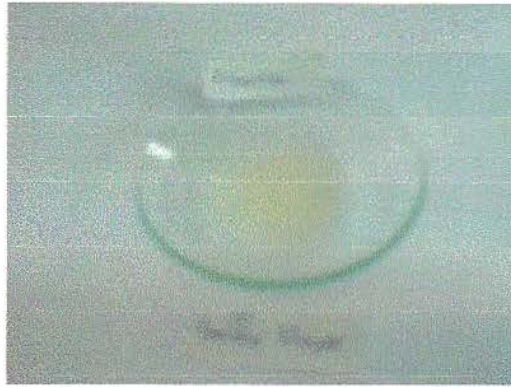
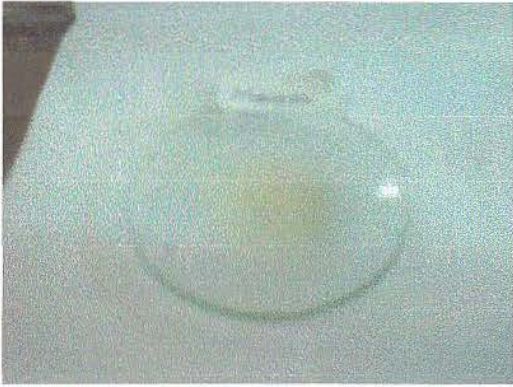


Gambar Pengujian tanin pada rumput mutiara ( positif tanin, warna hitam )

Lampiran 8. Penapisan Fitokimia pada pengujian alkaloid dengan pereaksi Mayer

sebelum

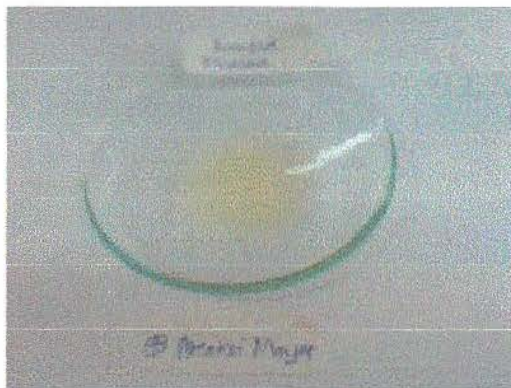
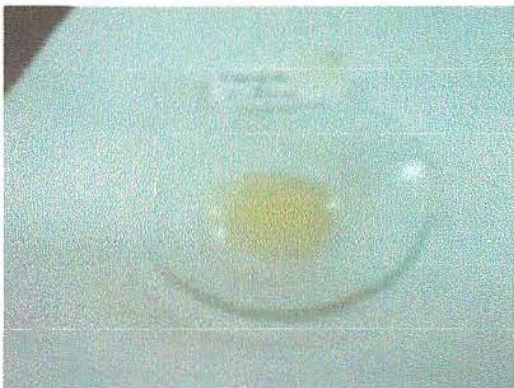
sesudah



Gambar. Pengujian alkaloid pada Meniran sebelum dan sesudah penambahan Mayer (negatif alkaloid)

sebelum

sesudah



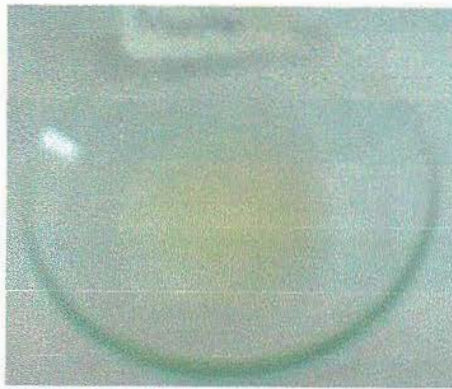
Gambar. Pengujian alkaloid pada rumput mutiara sebelum dan sesudah penambahan Mayer (negatif alkaloid)

Lampiran 8. Penapisan Fitokimia pada pengujian alkaloid dengan pereaksi Dragendorf

sebelum

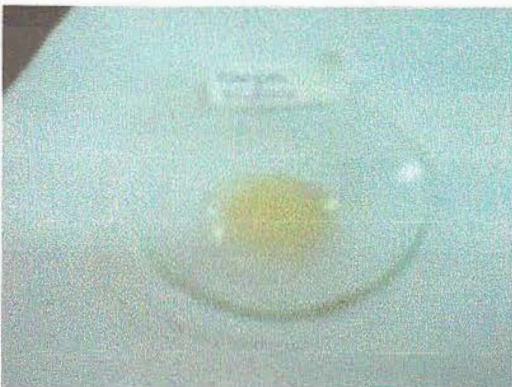


sesudah



Gambar. Pengujian alkaloid pada Meniran sebelum dan sesudah penambahan Dragendorf (negatif alkaloid)

sebelum



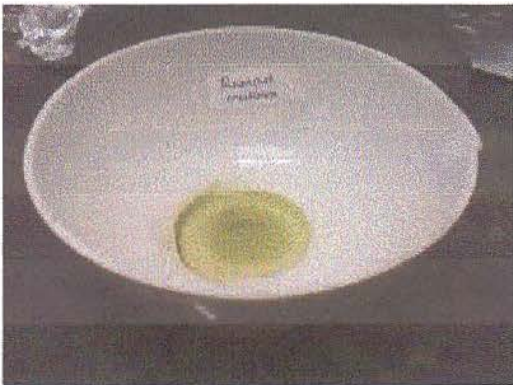
sesudah



Gambar. Pengujian alkaloid pada rumput mutiara sebelum dan sesudah penambahan Dragendorf (negatif alkaloid)

Lampiran 9. Penapisan Fitokimia pada pengujian steroid dan Triterpenoid

sebelum

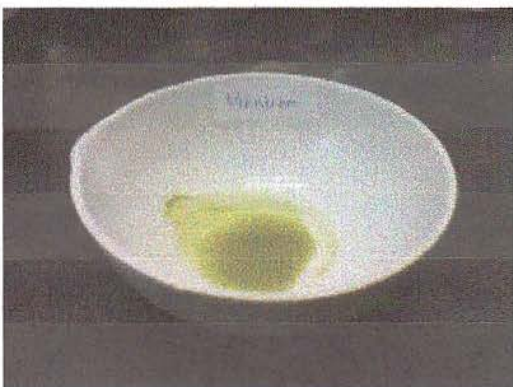


sesudah

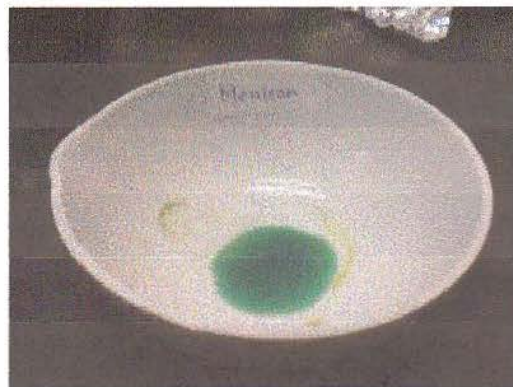


Gambar. Pengujian Steroid pada rumput mutiara (positif warna ungu)

sebelum



sesudah



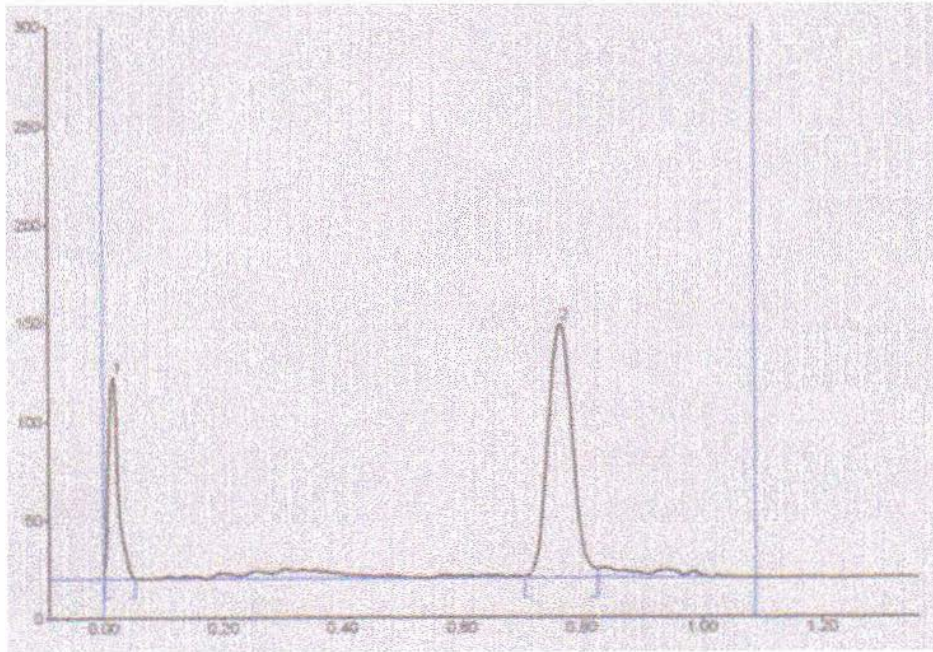
Gambar. Pengujian triterpenoid pada meniran (positif warna hijau)

Lampiran 10. Penapisan Fitokimia pada pengujian Turunan kinon

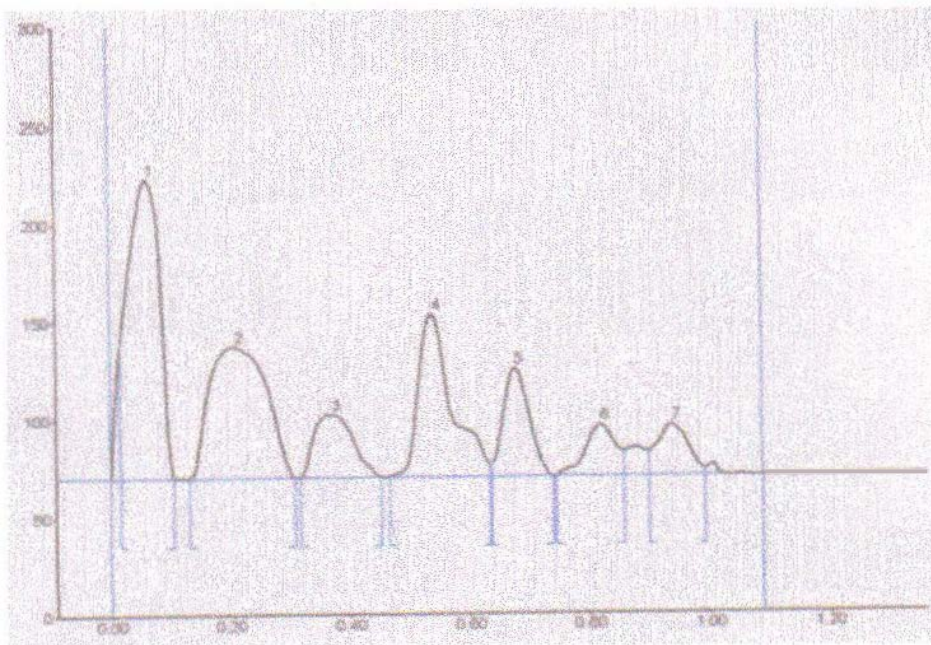


Gambar. Pengujian turunan kinon pada meniran dan rumput mutiara (pada meniran positif warna hijau, pada rumput mutiara positif warna merah muda)

Lampiran 11. Kromatogram Ekstrak Meniran



Gambar . Kromatogram Standar Phylanthin Pada Panjang Gelombang 250nm.



Gambar . Kromatogram Ekstrak Meniran Pada Panjang Gelombang 250nm