

Efek Immunostimulan Ekstrak Etanolik Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap IgG Mencit Jantan

SHIRLY KUMALA^{1*}, AULIA TISNA DEWI¹, YUN ASTUTI NUGROHO²

¹Fakultas Farmasi Universitas Pancasila,
Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640

²Badan Penelitian dan Pengembangan Farmasi,
JI Percetakan Negara No. 23, Jakarta

Diterima 20 Maret 2004, Disetujui 3 Mei 2004

Abstract: The immunostimulating effect of an ethanolic extract of Pegagan herbs to male mice has been determined. Thirty male mice divided into five groups (P1 - P5) were induced by 1 % sheep red cells for 14 days. P1, P2 and P3 were treated with three doses of an ethanolic extract 4.124 mg/20g BW, 8.25 mg/20g BW and 16.5mg/20gBW respectively. P4 was a positive control using Stimuno 0.55 mg/20g BW, and P5 was a negative control using distilled water. Blood samples were taken at day 1, 8 and 15, and the concentration of IgG was measured by Radial Immunodiffusion method. A two way Anova showed no significant difference between P1, P2, and P5, but P3 was higher than P4. The obtained results showed that the ethanolic extract of 16,5 mg has a potent immunostimulating effect.

Key words: IgG, *Centella asiatica*, immunostimulating effect, sheep red cells

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini dunia barat mulai memalingkan kembali perhatiannya ke alam, yang terkenal dengan semboyan *back to nature*, mengikuti dunia timur, khususnya Asia yang sampai detik ini pun masih tetap memanfaatkan obat alami dalam upaya pelayanan kesehatan di samping obat sintetik. Hal ini karena timbul kepercayaan masyarakat barat bahwa obat alami, termasuk obat nabati, dapat berperan dalam upaya pemeliharaan, peningkatan, dan pemulihan kesehatan serta pengobatan penyakit. Di samping itu diyakini pula bahwa obat alami kurang memberikan efek samping jika dibandingkan dengan obat sintetik⁽¹⁾.

Salah satu upaya pencegahan penyakit adalah melalui peningkatan daya tahan tubuh yaitu dengan meningkatkan efektivitas sistem imunitas tubuh supaya sel-sel imun dapat terus melawan penyebab penyakit dan tubuh dapat terhindar dari berbagai penyakit.

Manusia sejak dilahirkan telah dilengkapi dengan sistem pertahanan tubuh yang spesifik maupun yang non spesifik. Dengan sistem pertahanan tubuh yang

disebut sistem imun ini diharapkan manusia dapat menangkal berbagai bakteri, virus, jamur, dan zat-zat asing lain yang dapat menimbulkan berbagai gangguan penyakit⁽²⁾.

Respon imun diperlukan untuk 3 hal yaitu pertahanan tubuh terhadap infeksi mikroorganisme, homeostasis terhadap eliminasi komponen-komponen tubuh yang sudah tua, dan pengawasan terhadap penghancuran sel-sel yang bermutasi terutama yang menjadi ganas. Dengan kata lain, respon imun dapat diartikan sebagai suatu sistem agar tubuh dapat mempertahankan keseimbangan antara lingkungan di luar dan di dalam tubuh⁽³⁾.

Imunomodulator merupakan zat atau pun obat yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem kekebalan yang terganggu dengan cara merangsang dan memperbaiki fungsi sistem kekebalan⁽³⁾.

Tumbuhan obat yang bekerja pada sistem imunitas bukan hanya bekerja sebagai efektor yang langsung menghadapi penyebab penyakitnya, melainkan bekerja melalui pengaturan imunitas. Bahan-bahan yang bekerja demikian digolongkan sebagai imunomodulator. Jadi apabila kita mengobati penyakit yang disebabkan oleh infeksi mikroorganisme dengan imunomodulator, maka imunomodulator tersebut tidak akan menghadapi secara

* Penulis korespondensi, Hp. 08129026821,
e-mail: fskumala@yahoo.com

langsung mikroorganismenya, melainkan sistem imunitas akan didorong untuk menghadapi melalui efektor sistem imunitas⁽⁴⁾.

Salah satu tanaman yang dikenal luas sebagai obat adalah pegagan (*Centella asiatica* L.). Dari berbagai penelitian yang dilakukan oleh ahli farmakologi, ternyata pegagan memiliki efek farmakologi untuk menjaga kesehatan tubuh. Pegagan telah dikenal sebagai obat untuk revitalisasi tubuh dan pembuluh darah serta mampu memperkuat struktur jaringan tubuh⁽⁵⁾.

Dalam penelitian ini akan diuji pengaruh ekstrak herba pegagan terhadap sistem kekebalan tubuh mencit jantan yang terlebih dahulu diinduksi dengan sel darah merah domba (SDMD), lalu ditetapkan kadar IgG dengan metode *radial immunodiffusion* (RID).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Herba pegagan (*Centella asiatica* L.) yang diperoleh dari Kebun Tanaman Obat Karya Sari, Jakarta dan dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor. Hewan Coba yang digunakan adalah 30 ekor mencit putih (*Mus musculus*) galur DDY, berusia 3-4 bulan, jenis kelamin jantan dengan bobot badan 20-40 g. Mencit diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Pusat Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Sel darah merah domba (SDMD) yang telah diberi antikoagulan diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. *Phosphat buffer saline* (PBS), etanol 70%, antikoagulan, gel agarosa yang mengandung anti-IgG.

METODE. Metode eksperimen, dengan memberikan ekstrak pegagan secara oral pada mencit jantan yang sebelumnya telah diinduksi dengan sel darah merah domba, kemudian diambil serumnya untuk ditetapkan kadar IgG-nya menggunakan metode RID.

Pembuatan ekstrak pegagan secara perkolasi. Ekstrak dibuat sesuai ketentuan untuk pembuatan ekstrak⁽⁶⁾. Sebanyak ± 500 g serbuk simplisia dibasahi dengan ± 2,5 l etanol 70%, dimasukkan dalam bejana tertutup ± 3 jam sambil sering dikocok. Setelah itu dipindahkan serbuk basah tersebut sedikit demi sedikit ke dalam perkolator. Etanol 70% dituang secukupnya sampai cairan mulai menetes dari perkolator, kemudian kran perkolator ditutup dan dibiarkan 24 jam. Setelah itu kran perkolator dibuka dan cairan penyari dibiarkan

menetes dengan kecepatan 1 ml per menit, sambil ditambah terus menerus etanol 70% ke dalam perkolator sehingga di atas serbuk simplisia selalu terdapat lapisan cairan penyari. Perkolasi dihentikan apabila 500 mg cairan yang menetes diuapkan tidak meninggalkan sisa. Perkolat yang diperoleh diuapkan dengan tekanan rendah pada suhu 50°C selama 1-2 jam lalu dikeringkan.

Pembuatan suspensi sel darah merah domba 1%. Darah domba segar yang telah diberi anti-koagulan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm untuk memisahkan plasma dari sel darah merah. Lapisan atas yang berupa plasma dibuang dengan menggunakan pipet Pasteur dan pada lapisan bawah yang berupa endapan sel darah merah ditambahkan larutan PBS pH 7,2 sebanyak tiga kali volume SDMD yang tersisa. Tabung kemudian dibolak-balik dengan perlahan-lahan sampai SDMD tersuspensi secara homogen. Kemudian suspensi SDMD disentrifugasi lagi. Prosedur ini diulang sampai lapisan atas benar-benar jernih dan tidak berwarna. Lapisan atas yang jernih dibuang dan lapisan bawah adalah suspensi SDMD 100%. Selanjutnya, diambil 0,5 ml suspensi SDMD 100% dan ditambahkan PBS dengan volume yang sama sehingga diperoleh suspensi SDMD 50%. Untuk mendapatkan suspensi SDMD 1%, maka dari 1 ml suspensi SDMD 50% ditambahkan PBS hingga 50 ml^(7,8).

Adaptasi dan pengelompokan hewan coba. Penelitian dilakukan terhadap 30 ekor mencit yang dibagi ke dalam 5 kelompok secara acak, kemudian diadaptasikan selama 1 minggu.

Pemberian SDMD 1% dan ekstrak herba pegagan. SDMD 1% diberikan 1 kali secara intra peritonium pada P1 sampai P5 dengan dosis 0,2 ml/20 gBB. Setelah 24 jam, P1 sampai P3 diberi ekstrak pegagan secara oral sesuai dosis masing-masing kelompok. P4 diberi Stimuno secara oral sesuai dosisnya, sedangkan P5 diberi air suling. Pemberian ekstrak pegagan dan Stimuno dilakukan selama 14 hari berturut-turut.

Pengambilan darah mencit. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke-1 (sebelum perlakuan), hari ke-8 dan hari ke-15. Sampel berupa serum yang diambil dari masing-masing individu tiap kelompok dosis. Pengambilan darah dilakukan lewat vena orbitalis yang terdapat pada mata mencit dengan menggunakan *capillar tube* hingga diperoleh ± 0,5 ml darah. Selanjutnya darah dibiarkan membeku ± 1 jam agar pemisahan darah dari serum berlangsung sempurna. Tabung-tabung tersebut dimasukkan dalam alat sentrifuga dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit. Lapisan atas yang jernih (serum) diambil dengan alat suntik steril.

Serum yang diperoleh disimpan dalam lemari beku dengan suhu -20°C sampai reaksi presipitasi dilakukan. Tabung-tabung berisi serum tersebut ditutup rapat selama penyimpanan.

Penetapan kadar IgG dengan metode Radial immunodiffusion. Pembuatan kurva standar. Pembuatan kurva standar menggunakan serum standar yang telah diketahui konsentrasinya yaitu 1200 mg/dl, lalu diencerkan menjadi 600 mg/dl dan 300 mg/dl dengan menggunakan larutan PBS pH 7,2. Ketiga serum standar tersebut disuntikkan masing-masing sebanyak 5 μl ke dalam sumur pada lempeng gel agarosa yang mengandung anti IgG, kemudian diinkubasi dalam lemari pendingin selama 48 jam. Cincin presipitasi yang terbentuk diukur diameternya (mm) dengan menggunakan alat *immunoviewer*. Kurva standar dibuat dengan menghubungkan konsentrasi serum standar dengan kuadrat diameter cincin presipitasi.

Pengujian terhadap serum uji. Serum uji disuntikkan sebanyak 5 μl ke dalam sumur pada lempeng gel agarosa yang mengandung anti IgG. Kemudian diinkubasi dalam lemari pendingin selama 48 jam. Cincin presipitasi yang terbentuk diukur

diameternya (mm) menggunakan alat *immunoviewer*. Kadar IgG (mg/dl) yang merupakan konsentrasi serum dapat langsung dibaca pada kurva standar berdasarkan hasil pengukuran kuadrat diameter cincin presipitasi masing-masing serum.

Analisis data. Data hasil penetapan kadar IgG diuji kenormalan dan homogenitasnya. Jika data telah normal dan homogen, dilakukan uji parametrik analisis varian (anova) dua arah menggunakan sistem SAS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji kenormalan dan uji homogenitas terhadap data kadar IgG menunjukkan bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen sehingga data dapat dianalisis dengan analisis statistik parametrik menggunakan metode analisis varian dua arah (data disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1). Uji anova dua arah menunjukkan adanya beda nyata kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) atau uji Duncan^(9,10).

Metode RID digunakan untuk penetapan kadar IgG karena sederhana aplikasinya, praktis dan hanya memerlukan sedikit sampel.

Tabel 1. Hasil penetapan kadar IgG rata-rata dari tiap kelompok

Kelompok	Kadar IgG (mg/dl) Hari ke-	N	Rata-rata	SD
P1	1	6	1006,833	83,629
	8	6	1030,000	92,563
	15	6	1107,167	98,353
P2	1	6	1001,000	67,764
	8	6	1046,833	68,968
	15	6	1133,500	52,725
P3	1	6	1006,333	15,845
	8	6	1177,833	118,581
	15	6	1399,167	130,978
P4	1	6	1001,667	39,863
	8	6	1101,333	58,873
	15	6	1253,333	85,591
P5	1	6	990,000	50,841
	8	6	1039,000	56,622
	15	6	1081,667	53,601

Keterangan:

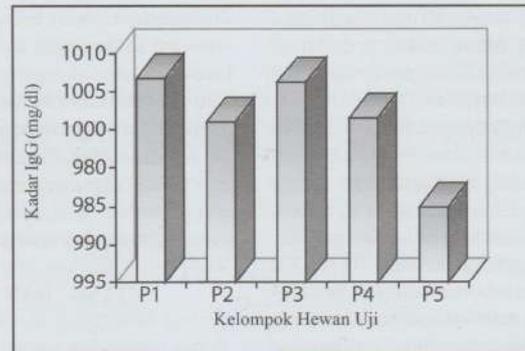
P1 : Kelompok perlakuan yang diberi SDMD 1% dan ekstrak pegagan dosis 4,125 mg/20gBB

P2 : Kelompok perlakuan yang diberi SDMD 1% dan ekstrak pegagan dosis 8,25 mg/20gBB

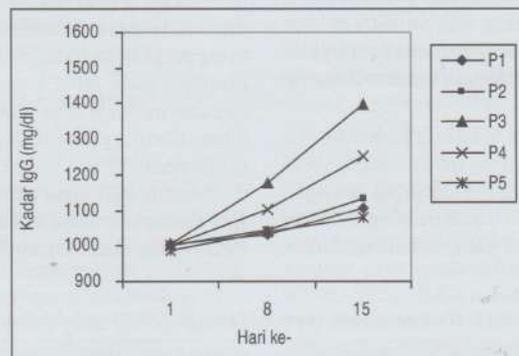
P3 : Kelompok perlakuan yang diberi SDMD 1% dan ekstrak pegagan dosis 16,5 mg/20gBB

P4 : Kelompok kontrol (+) yang diberi SDMD 1% dan STIMUNO dosis 0,55 mg/20gBB

P5 : Kelompok kontrol (-) yang hanya diberi SDMD 1%



Gambar 1. Diagram batang kadar IgG rata-rata pada hari ke-1 dengan waktu.



Gambar 2. Grafik hubungan antara kadar IgG dengan waktu.

Pemberian suspensi SDMD 1% yang digunakan sebagai antigen pada mencit dimaksudkan untuk merangsang pembentukan antibodi spesifik. Suspensi SDMD 1% dipilih untuk imunisasi karena sifat antigeniknya tinggi dan antibodi yang terbentuk mudah dideteksi dengan reaksi presipitasi yang mudah dilakukan. Injeksi antigen ini dilakukan secara intraperitoneal agar didapatkan reaksi respon imun yang cepat dan maksimal. Pada pembuatan suspensi SDMD 1% digunakan PBS sebagai larutan pencuci dan larutan pengencer. Pencucian SDMD bertujuan untuk memperoleh sel darah merah domba yang murni artinya tidak dicemari oleh protein serum. Larutan PBS yang digunakan merupakan dapar isotonis dengan pH 7,2 sehingga diperkirakan tidak akan mempengaruhi kondisi normal dari sel darah merah domba⁽¹¹⁾.

Dosis ekstrak pegagan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari LD_{50} ekstrak pegagan untuk mencit secara intraperitoneal. Pemilihan dosis tersebut penting untuk menghindari dosis yang terlalu tinggi sehingga dapat menyebabkan kematian pada

mencit⁽¹²⁾. Serum standar yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi adalah bentuk serbuk yang dilarutkan dalam larutan PBS pH 7,2 dan dibuat menjadi 3 konsentrasi masing-masing 1200 mg/dl, 600 mg/dl dan 300 mg/dl. Serum standar digunakan bentuk serbuk karena lebih stabil daripada bentuk larutan. Serum standar ini diperoleh dari kit.

Pada penelitian untuk melihat efek imunostimulan dari ekstrak herba pegagan dilakukan penetapan kadar IgG, karena IgG merupakan molekul efektor yang terbesar dalam sistem imun humoral. IgG berjumlah sekitar 75% dari total imunoglobulin pada plasma darah orang sehat. Antibodi yang diproduksi pertama kali oleh sel B adalah IgM. Sekali produksi konsentrasi IgM meningkat dengan cepat dalam serum darah. Beberapa jam setelah IgM diproduksi, sel B mulai memproduksi IgG yang kemudian akan meningkat konsentrasinya dengan cepat melebihi konsentrasi IgM. Selain itu, IgG memiliki kemampuan hidup yang paling lama yaitu 23 hari.

Pada grafik hubungan antara kadar IgG rata-rata dengan waktu, pada hari ke-8 dan ke-15, masing-

masing kelompok memperlihatkan kadar IgG yang bervariasi, sedangkan pada hasil uji analisis varian dua arah kadar IgG P1, P2, dan P5 pada hari ke-8 dan ke-15 tidak terdapat perbedaan bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pegagan pada dosis P1 dan P2 tidak memberikan efek imunomodulator karena kadar IgG yang dihasilkan masih sama dengan kadar IgG pada P5 (kontrol negatif) yang hanya diinduksi SDMD 1%. Hasil uji analisis varian pada P3 dan P4 pada hari ke-8 tidak ada perbedaan bermakna, sedangkan pada hari ke-15 P3 mengalami peningkatan kadar IgG.

Kecenderungan peningkatan kadar IgG pada dosis P3 disebabkan karena kandungan dari pegagan yaitu alkaloid dan terpenoid yang bersifat imunostimulator. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wagner yang secara umum menyebutkan bahwa golongan terpenoid, alkaloid atau polifenol mempunyai sifat imunostimulator⁽¹³⁾. Secara umum, pegagan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan saponin^(5,14).

Kadar IgG P4 pada hari ke-15 terlihat lebih rendah dibanding P3, hal ini kemungkinan karena berdasarkan aturan pemakaiannya diketahui bahwa Stimuno diberikan selama 30 hari, sedangkan pada penelitian ini Stimuno hanya diberikan selama 14 hari karena mengingat kondisi mencit yang tidak memungkinkan untuk pemberian selama 30 hari sehingga kadar IgG P4 belum meningkat secara optimal. Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa efek imunostimulan ekstrak pegagan pada dosis P3 lebih cepat dibanding P4 (Stimuno).

Pada kelompok P5 (kontrol negatif) yang hanya diberi SDMD 1%, akibat rangsangan antigen spesifik tersebut, akan terjadi respon imun primer berupa kenaikan jumlah antibodi (kadar IgG). Produksi antibodi yang terbentuk sebanding dengan jumlah antigen yang disuntikkan, tapi lama-kelamaan jumlah antigen berkurang, maka antibodi yang terbentuk atas rangsangan antigen juga berkurang. Oleh karena P5 tidak diberi ekstrak pegagan yang berfungsi sebagai imunostimulator sehingga kadar IgG meningkat sangat lambat. Dengan demikian, pemberian ekstrak pegagan pada dosis P3 dapat memacu respons imun.

SIMPULAN

Ekstrak etanolik herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.) dosis 6,5 mg/20 gBB dapat meningkatkan kadar IgG mencit yang diinduksi sel darah merah domba sedangkan ekstrak etanolik dengan dosis 16,5 mg/20 g BB memberikan efek imunostimulan yang lebih baik dibandingkan dengan

pemberian Stimuno pada dosis 0,55 mg/20 g BB sebagai kontrol positif.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif dari ekstrak etanolik herba pegagan sebagai imunostimulator. Penggunaan hewan coba lain yang kondisinya lebih memungkinkan untuk waktu penelitian yang lebih panjang juga perlu dilakukan agar dapat diketahui waktu peningkatan dan penurunan kadar IgG yang optimal. Selanjutnya, pemeriksaan histopatologi terhadap limpa mencit juga perlu dilakukan untuk melihat keberadaan sel T dan sel B.

DAFTAR PUSTAKA

- Hargono D. Sekelumit mengenai obat nabati dan sistem imunitas. Cermin Dunia Kedokteran; 1996. hal. 108-59.
- Tjokronegoro A. Peranan mikroorganisme dan komponennya sebagai imunomodulator sistem imun tubuh manusia. Majalah Kedokteran Indonesia. 1990;40(11):613-19.
- Bratawidjaja KG. Imunologi dasar. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2002. hal. 119-25.
- Subowo. Efek imunomodulator dari tumbuhan obat. Warta Tumbuhan Obat Indonesia. 1996.3(1):1-4.
- Winarto WP. Khasiat dan manfaat pegagan tanaman penambah daya ingat. Edisi I. Jakarta: Agromedia Pustaka; 2003. hal. 6-10.
- Hargono D, Sumali W. Cara pembuatan ekstrak. Jakarta: Depkes RI; 1986. hal. 9-10.
- Kabat EA. The reagent of immunology detection of antigen-antibody interaction: structural concept in immunology and immunochemistry. New York: Holt Rinehart Winston Inc; 1986. p. 27-40.
- Nisonoff A. Immunological assays and purification and antibodies, introduction to molecular immunology. Massachusetts: Sinauer Ass Inc; 1982. p. 141-45.
- Scheffler WC. Statistik untuk biologi, farmasi, kedokteran, dan ilmu yang bertautan. Terbitan kedua. Diterjemahkan oleh Suroso. Bandung: Institut Teknologi Bandung-Press; 1978. hal. 107.
- Usman H, Akbar PS. Pengantar statistik. Jakarta: Bumi Aksara; 1985. hal. 271-72.
- Garvey JS, NA Cremer, DH Sussdorf. Cellular antigens: methods in immunology. 3rded. New York: Addison Wesley Publishing Co Inc; 1977. p. 347-71.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Tinjauan hasil penelitian obat di berbagai institusi. Edisi II. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi; 1995. hal. 21-23.
- Wagner H. Immunostimulants of fungi and higher plants, definition scope aims stimulants; 1984. p. 26-32.
- Syamsuhidayat SS, Hutapea JR. Inventaris tanaman obat Indonesia (I). Jakarta: Badan Penelitian dan

