



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH
MENGKUDU (*morinda citrifolia*.L) TERHADAP
IL-4 IL-10 DAN IgE PADA MENCIT PUTIH
JANTAN HIPERSESITIVITAS TIPE I**

DISERTASI



**YUFRI ALDI
07301002**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ANDALAS
2013**

LEMBARAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : YUFRI ALDI

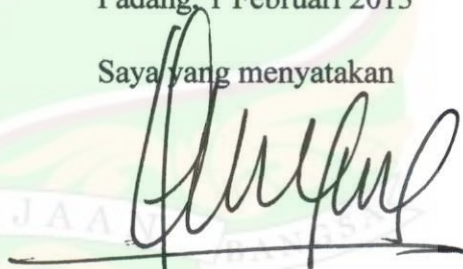
No. BP : 07301002

dengan ini menyatakan bahwa disertasi saya yang berjudul PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH MENGGKUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP IL-4, IL-10 DAN IgE PADA MENCIT PUTIH JANTAN HIPERSENSITIVITAS TIPE I adalah asli hasil karya cipta saya sendiri. Jika dikemudian hari diketahui pernyataan saya ini tidak benar, maka saya bersedia menanggung segala konsekwensi atas ketidak benaran pernyataan ini sesuai dengan peraturan dan perundangan yang berlaku.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dan ditandatangani untuk dapat dipergunakan sesuai dengan keperluan.

Padang, 1 Februari 2013

Saya yang menyatakan



YUFRI ALDI

Telah diuji pada Ujian Tertutup

Tanggal 20 Desember 2012

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. dr. Yanwirasti, PA(K)

Anggota : Prof. Dr. dr. Ellyza Nasrul, Sp.PK(K)

Prof. Dr. Dian Handayani, Apt.

Prof. Dr. Dr. Eryati Darwin, PA(K)

Prof. Dr. Amri Bakhtiar, MS. Apt.

Dr. Dr. Hafni Bachtiar, MPH.

dr. Zulkarnain Edward, M.Sc. Ph.D

Dr. Elfahmi, M.Si. Apt. (Penguji Eksternal, ITB)

Ditetapkan dengan

Surat Tugas Dekan

Fakultas Kedokteran Univ. Andalas

Nomor : 474/UN.16.02/D/PP/2013

Tanggal : 09 Januari 2013

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang yang telah memberikan karunia dan hidayah-Nya, sehingga penulis diberikan kekuatan, ketabahan, kesabaran serta tuntunan-Nya dalam menyelesaikan penulisan disertasi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

Penulisan disertasi ini merupakan salah satu persyaratan untuk meraih gelar akademik Doktor dalam bidang Ilmu Biomedik di Program Studi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Disertasi yang berjudul **PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH MENGKUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP IL-4, IL-10 DAN IgE PADA MENCIT PUTIH JANTAN HIPERSENSITIVITAS TIPE I**, diharapkan dapat menjadi salah satu bahan rujukan dalam pengembangan keilmuan terutama dalam bidang ilmu biomedik dan ilmu farmakoimunologi pada khususnya.

Kajian ini menyangkut tentang pencarian senyawa baru dari bahan alam khususnya tumbuhan yang digunakan dalam pengobatan reaksi hipersensitivitas tipe I. Berdasarkan dari keinginan tersebutlah penulis ingin mengetahui lebih jauh tentang pengaruh pemberian senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap kadar IL-4, IL-10 dan IgE pada mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I.

Penulis sangat menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritikan dan saran para pembaca sangat penulis harapkan. Semoga disertasi ini bermanfaat adanya.

Penulis,

UCAPAN TERIMA KASIH

Atas Rahmat dan Karunia Allah SWT penulis telah dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi berjudul **“Pengaruh Skopoletin dari Buah Mengkudu Terhadap IL-4, IL-10 dan IgE pada Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I”**.

Penulis menyadari bahwa selama proses penulisan disertasi ini tidak terlepas dari peran serta dan dukungan dari promotor, para guru besar dan seluruh staf pengajar mata kuliah yang ada di Program Studi Ilmu Kedokteran Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. Dr.dr. Ellyza Nasrul Sp.PK (K) selaku Promotor yang telah dengan sabar, ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan bimbingannya dan juga dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.
2. Prof. Dr.dr. Yanwirasti, PA. (K) selaku Ko Promotor I dan dan juga sebagai Ketua Program Ilmu Kedokteran Pascasarjana Fakultas Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas yang telah dengan sabar, ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan bimbingannya dan juga dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.
3. Prof. Dr. Dian Handayani, Apt selaku Ko Promotor II yang telah dengan sabar, ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu dan bimbingannya dan juga

dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.

4. Prof. Dr. Amri Bakhtiar, MS. DESS. Apt, Dr. Eryati Darwin, PA(K), Dr. Dr. Hafni Bachtiar, MPH dan dr. Zulkarnain Edward, M.Sc. Ph.D. selaku Penguji dan dengan sabar, ikhlas dan meluangkan waktu serta memberikan ilmu, juga dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.
5. Rektor Universitas Andalas yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk mengikuti kuliah di Program Pascasarjana Universitas Andalas.
6. Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas Prof. Dr. Syafruddin Karimi, SE. MA. dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas Prof. Dr. Hazli Nurdin, MSc dan Prof. Dr. Ir.Novirman Jamarun, MSc. yang telah memerikan kesempatan pada penulis untuk mengikuti Program S3 Biomedik Pascasarjana Universitas Andalas.
7. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk mengikuti Program S3 Biomedik Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
8. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Andalas Dr. Muslim Suardi, MSi, Apt dan mantan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Andalas Prof. Dr. Dacriyanus, Apt. yang memberikan dukungan moril, dorongan serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini

9. Seluruh staf dosen di Program Pascasarjana Universitas Andalas khususnya Program Studi S3 Biomedik yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang memberikan bekal ilmiah untuk persiapan penyelesaian disertasi ini.
10. Seluruh dosen Program S1 Farmasi penulis di Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas dan dosen Program S2 Farmasi di ITB Bandung yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan ilmunya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Program Studi S3 Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
11. Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi, Laboratorium Sentral Fakultas Farmasi, Kepala Kebun Tanaman Obat Universitas Andalas yang telah memberi izin kepada penulis untuk menggunakan fasilitas laboratorium yang beliau pimpin sehingga semua data penelitian ini bisa diperoleh.
12. Kepada teman-teman seangkatan atas kekompakan dan keakrabannya selama studi berlangsung, seluruh teman-teman di Fakultas Farmasi, serta semua pihak yang tidak dapat penulis cantumkan satu-persatu yang telah membantu dalam penulisan ini.

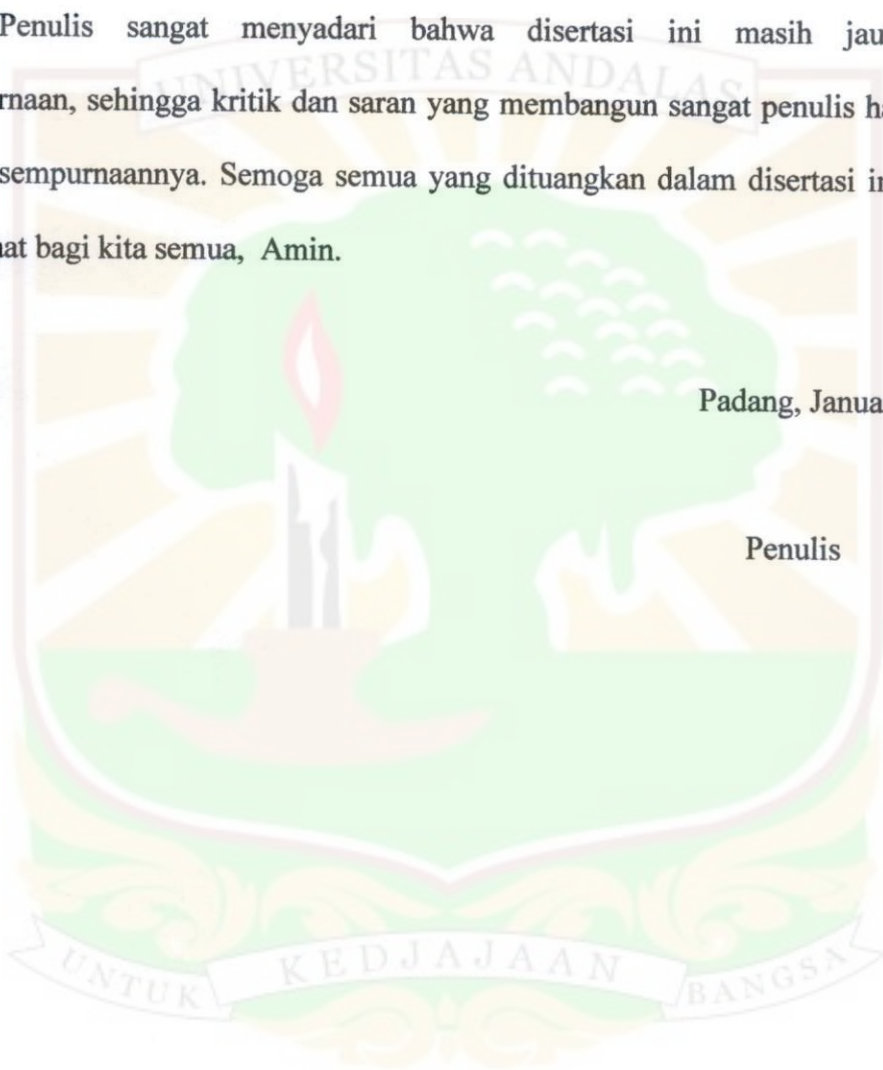
Akhirnya ucapan terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan kepada Istri Dra. Novita Latina, Apt, Alvinno Ganeshaputra, Alvinny Ganeshaputri, Muhammad Davicra Alvinanda dan Muhammad Bintang dan Papa dan Ibu atas do'a yang tiada henti, dukungan semangat dan pengertiannya merelakan waktu

kebersamaan menjadi berkurang selama menjalani pendidikan dan penelitian ini, juga kepada adik-adik Dr. dr. Afri Wardi, Sp.OK. M.Ag, Dra. Yusnawati, Dr. Ahmad Wira Dt Diko, M.Ag.M.Si. dan saudara lainnya, penulis mengucapkan terima kasih atas do'a dan dukungannya.

Penulis sangat menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan untuk kesempurnaannya. Semoga semua yang dituangkan dalam disertasi ini dapat bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Padang, Januari 2013

Penulis



RINGKASAN

PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH MENKUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP IL-4, IL-10 DAN IgE PADA MENCIT PUTIH JANTAN HIPERSENSITIVITAS TIPE I

Yufri Aldi

Salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat reaksi hipersensitivitas tipe I adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Hasil penelitian yang telah dilakukan khusus terhadap reaksi hipersensitivitas tipe I ternyata ekstrak etanol buah mengkudu dapat menghambat reaksi anafilaksis kutan aktif pada mencit putih jantan dan secara *in-vitro* dapat menghambat degranulasi mastosit yang tersensitisasi. Ekstrak etanol dari daunnya pada pemakaian topikal dapat menekan inflamasi. Penelitian terakhir juga diketahui ekstrak etanol buah mengkudu dapat meningkatkan titer antibodi mencit putih jantan yang diinduksi dengan sel darah merah kambing serta dapat meningkatkan jumlah sel limfosit, neutrofil batang dan sel eusinofil. Salah satu zat aktif yang terdapat di dalam ekstrak etanol buah mengkudu adalah skopoletin.

Dalam penelitian ini buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) diambil di Kelurahan Kurao Pagang, Kecamatan Nanggalo, Padang, Sumatera Barat, dan dilakukan identifikasi di Herbarium Andalas (ANDA) Universitas Andalas Padang. Buah yang sudah matang di potong tipis, biji dibuang dan dikeringkan, dijadikan serbuk. Proses isolasi senyawa skopoletin dari serbuk kering buah mengkudu sebanyak 960 g, dimulai dengan sokletasi menggunakan pelarut diklorometan. Ekstrak yang diperoleh di keringkan dan proses isolasi dilanjutkan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak campuran n-heksan dan etil asetat. Untuk memurnikan senyawa skopoletin yang diperoleh, dilakukan lagi pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *Sephadex* LH20 dan fase gerak metanol. Senyawa skopoletin didapat sebanyak 99,9 mg dan diidentifikasi secara spektroskopi UV, IR dan pengukuran jarak lehnya serta menentukan tingkat kemurniannya dengan menggunakan HPLC.

Untuk menjadikan mencit mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I maka hewan tersebut disuntik secara intraperitoneal dengan ovalbumin dosis 5 mg/20 g bb. Pada hari ke tiga mencit tersebut diberi ovalbumin lagi dengan dosis 5 mg/20 g bb secara subkutan. Hewan dinyatakan hipersensitivitas tipe I jika pada hari ke tujuh setelah penyuntikan ovalbumin pada tempat penyuntikan tersebut timbul warna kemerahan.

Mencit dibagi 5 kelompok, yaitu kelompok normal dan empat kelompok mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I. Kelompok I (normal) diberi larutan NaCMC, kelompok II kontrol positif (larutan NaCMC), kelompok III diberi senyawa skopoletin dosis 1 mg/kg bb, kelompok IV diberi senyawa skopoletin dosis

3 mg/kg bb dan kelompok V diberi senyawa skopoletin dosis 10 mg/kg bb. Pemberian larutan NaCMC dan senyawa skopoletin langsung diberikan pada saat terlihat tanda kemerahan ditempat penyuntikan. Pemberian sediaan dilakukan peroral dengan bantuan sonde standar mencit. Darah diambil dengan metode *guillotine* setelah 24 jam pemberian senyawa skopoletin. Kadar IL-4, IL-10 dan IgE dalam serum ditentukan dengan metoda ELISA.

Hasil pemeriksaan dari serum mencit hipersensitivitas tipe I setelah pemberian senyawa skopoletin dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb berturut-turut untuk kadar IL-4 adalah $84,87 \pm 4,87$ pg/mL, $69,20 \pm 13,95$ pg/mL dan $54,62 \pm 7,93$ pg/mL, kadar IL-10 adalah $326,60 \pm 33,90$ pg/mL, $289,60 \pm 36,82$ pg/mL dan $286,40 \pm 55,86$ pg/mL dan kadar IgE adalah $1032,25 \pm 198,04$ ng/mL, $777,25 \pm 153,34$ ng/mL dan $652,50 \pm 83,10$ ng/mL. Hasil analisis statistik dengan analisis varian satu arah terlihat perbedaan yang sangat bermakna dari penurunan kadar IL-4, IL-10 dan IgE mencit hipersensitivitas tipe I setelah pemberian senyawa skopoletin. Kemampuan senyawa skopoletin untuk menurunkan kadar IL-4 dan IgE mencit hipersensitivitas tipe I sampai pada kadar mencit normal diberikan oleh dosis 10 mg/kg bb sedangkan untuk kadar IL-10 penurunan sampai kadar normal diberikan oleh dosis 3 mg/kg bb.

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian senyawa skopoletin dari buah mengkudu dapat menurunkan kadar IL-4, IL-10 dan IgE pada mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I.



SUMMARY

THE EFFECT OF SCOPOLETIN ISOLATED FROM NONI FRUIT (*Morinda citrifolia* L.) ON THE LEVEL OF IL-4, IL-10 AND IgE IN WHITE MALE MICE WITH TYPE I HYPERSENSITIVITY

Yufri Aldi

One of the plant used to treat type I hypersensitivity reaction is noni fruit (*Morinda citrifolia* L.). Previous studies have shown that ethanolic extract of noni fruit could inhibit cutaneous anaphylactic reaction on male mice and in-vitro inhibition of sensitized mastocyte degranulation. Ethanolic extract from its leaves in topical usage could suppress inflammation. Recent research of noni ethanol extract has been known to increase antibody titer on white male mice which was induced by goat red blood cells and also increase the amount of lymphocyte, neutrophil, and eosinophil. Scopoletin is one of the active compound that contained in ethanolic extract of noni fruit.

Noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) used in the present study was taken from Kurao Pagang-Nanggalo, Padang City in West Sumatra. The plant identification was performed in Andalas Herbarium (ANDA), Andalas University, Padang, West Sumatra. The mature fruits were cut slightly, while the seeds were removed and dried and then made into powder. The isolation of 960 gram dry powder of noni fruit was started with soxhlet by using dichloromethane. The extract was then being dried and isolation process was continued with coloumn chromatography by using *silica gel* as stationary phase and mixture of n-hexane and ethyl acetat as mobile phase. The scopoletin was purified with column chromatography by using *Sephadex* LH20 as stationary phase and methanol as mobile phase. 99,9 mg pure scopoletine obtained was determined by using UV, IR spectroscopy methods and measuring its melting point, while the purity grade was determined by using HPLC method.

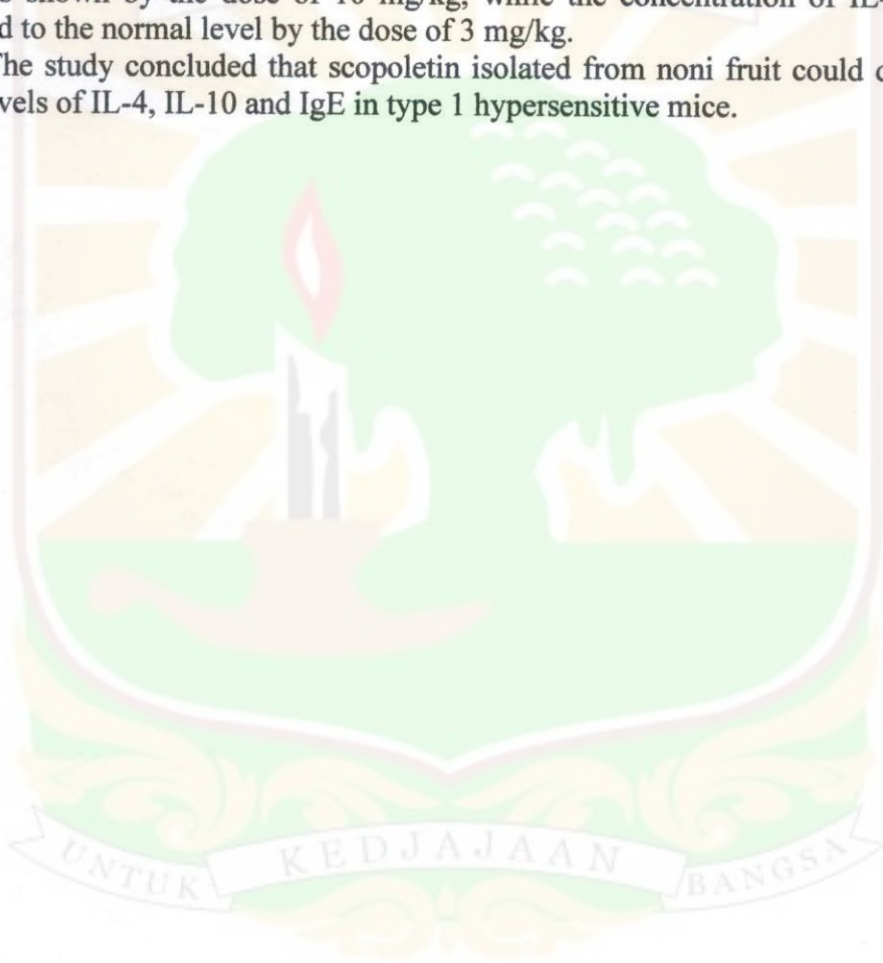
To induce type I hypersensitive reaction, the experimental animals were injected intraperitoneally with ovalbumine with dose of 5 mg/20 g. On the 3rd day, mice were injected with ovalbumine with dose of 5 mg/20 g subcutaneously. The animals were claimed to have type I hypersensitivity reaction if the reddish color appeared on the 7th day after ovalbumine injection.

Mice were divided in to 5 groups consisted of 1 normal group and 4 treatment group with type I hypersensitive reaction. Group I (normal) was administered with NaCMC suspension, group II (positive control) with Na CMC suspension, group III with scopoletin with dose 1 mg/kg, group IV with scopoletin with dose 3 mg/kg and group V with scopoletin with dose 10 mg/kg. The administration of NaCMC suspension and scopoletin was directly administered when the reddish color appeared. The administration of drug preparation was performed orally (gavage). The blood was collected 24 hours after scopoletin adminsitration by

means of *guillotine* method. The concentration of IL-4, IL-10 and IgE concentration were determined by using *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) method.

Serum examination showed that the concentration of IL-4, IL-10, and IgE after administration of scopoletin in the doses of 1, 3, and 10 mg/kg were 84.87 ± 4.87 pg/mL; 69.20 ± 13.95 pg/mL; and $54,62 \pm 7,93$ pg/mL for IL-4, 326.60 ± 33.90 pg/mL; 289.60 ± 36.82 pg/mL ; and 286.40 ± 55.86 pg/mL for IL-10, and 1032.25 ± 198.04 ng/mL; 777.25 ± 153.34 ng/mL; and $652,50 \pm 83.10$ ng/mL for IgE, respectively. One way ANOVA statistical analysis showed that scopoletin significantly decreased the levels of IL-4, IL-10 and IgE in type I hypersensitive mice. The ability of scopoletin to decrease IL-4 and IgE concentration of type I hypersensitive mice to the normal level was shown by the dose of 10 mg/kg, while the concentration of IL-10 was decreased to the normal level by the dose of 3 mg/kg.

The study concluded that scopoletin isolated from noni fruit could decrease serum levels of IL-4, IL-10 and IgE in type 1 hypersensitive mice.



ABSTRAK
PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH MENGGUDU
(*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP IL-4, IL-10 DAN IgE PADA
MENCIT PUTIH JANTAN HIPERSENSITIVITAS TIPE I

Yufri Aldi

Hipersensitivitas tipe I adalah respon imun berlebihan yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan dan segera timbul setelah alergen masuk ke dalam tubuh yang telah terpapar sebelumnya oleh alergen tersebut. Antibodi yang bertanggung jawab dalam reaksi hipersensitivitas tipe I adalah IgE dan produksinya diatur oleh IL-4 dan IL-10.

Telah dilakukan penelitian eksperimental laboratorium pada mencit putih jantan (*Mus musculus* galur Webster) mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I. Hewan digunakan sebanyak 25 yang dibagi menjadi 5 kelompok. Pada penelitian ini dilihat pengaruh pemberian senyawa skopoletin dari buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap kadar IL-4, IL-10 dan IgE pada mencit putih jantan yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I. Kadar IL-4, IL-10 dan IgE ditentukan dengan metoda ELISA. Untuk menjadikan hewan hipersensitivitas tipe I, mencit disuntik secara intra peritoneal dengan ovalbumin dosis 5 mg/20 g bb dan hari ketiga berikan lagi secara subkutan dengan dosis yang sama. Mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I terlihat pada hari ketujuh ditandai dengan timbul warna kemerahan pada kulit setelah diberikan ovalbumin. Senyawa skopoletin diberikan peroral setelah mencit tersebut menunjukkan reaksi hipersensitivitas tipe I dengan dosis masing masing kelompok 1, 3 dan 10 mg/kg bb dan kelompok kontrol positif diberikan larutan NaCMC. Pada hari kedelapan mencit diambil serumnya dan ditentukan kadar IL-4, IL-10 dan IgE.

Hasil pemeriksaan dari serum mencit hipersensitivitas tipe I setelah pemberian senyawa skopoletin dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb berturut-turut untuk kadar IL-4 adalah $84,87 \pm 4,87$ pg/mL, $69,20 \pm 13,95$ pg/mL dan $54,62 \pm 7,93$ pg/mL, kadar IL-10 adalah $326,60 \pm 33,90$ pg/mL, $289,60 \pm 36,82$ pg/mL dan $286,40 \pm 55,86$ pg/mL dan kadar IgE adalah $1032,25 \pm 198,04$ ng/mL, $777,25 \pm 153,34$ ng/mL dan $652,50 \pm 83,10$ ng/mL. Hasil analisis statistik dengan analisis varian satu arah terlihat perbedaan yang sangat bermakna dari penurunan kadar IL-4, IL-10 dan IgE mencit hipersensitivitas tipe I setelah pemberian senyawa skopoletin. Kemampuan senyawa skopoletin untuk menurunkan kadar IL-4 dan IgE mencit hipersensitivitas tipe I sampai pada kadar mencit normal diberikan oleh dosis 10 mg/kg bb sedangkan untuk kadar IL-10 penurunan sampai kadar normal diberikan oleh dosis 3 mg/kg bb.

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian senyawa skopoletin dari buah mengkudu dapat menurunkan kadar IL-4, IL-10 dan IgE pada mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I.

Kata Kunci : Mengkudu, Skopoletin, Hipersensitivitas tipe I, IL-4, IL-10 dan IgE.

ABSTRACT

THE EFFECT OF SCOPOLETIN ISOLATED FROM NONI FRUIT (*Morinda citrifolia* L.) ON THE LEVEL OF IL-4, IL-10 AND IgE IN WHITE MALE MICE WITH TYPE I HYPERSENSITIVITY

Yufri Aldi

Type I hypersensitivity is an excessive and unexpected immune response because it causes immediate damage to certain tissues after an allergen exposed and entered the body. Immunoglobulin E (IgE) is the antibody responsible to this reaction whose production is regulated by IL-4 and IL-10.

An experimental study on the type I hypersensitive mice has been conducted in 25 male mice divided into 5 groups consisted of 5 mice each group. The effect of scopoletin isolated from noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) to IL-4, IL-10 and IgE levels was evaluated in type I hypersensitive mice. The concentration of IL-4, IL-10, and IgE were determined by using ELISA method. The mice were injected with ovalbumin 5 mg/20 g intraperitoneally to induce type I hypersensitivity reaction. The same doses were re-injected subcutaneously on the 3rd day. Type I hypersensitivity reaction was identified after another subcutaneous administration of ovalbumin 5 mg/20g on the 7th day as indicated by reddish color on the skin. Scopoletin was administered orally on the 7th day after the appearance of type I hypersensitivity reaction with the doses of 1, 3, and 10 mg/kg, while the control group was administered NaCMC suspension. On the 8th day, the serum was collected and the level of IL-4, IL-10, and IgE were determined.

Serum examination showed that the concentration of IL-4, IL-10, and IgE after administration of scopoletin in the doses of 1, 3, and 10 mg/kg were 84.87±4.87 pg/mL; 69.20±13.95 pg/mL; and 54.62±7.93 pg/mL for IL-4, 326.60±33.90 pg/mL; 289.60±36.82 pg/mL; and 286.40±55.86 pg/mL for IL-10, and 1032.25±198.04 ng/mL; 777.25±153.34 ng/mL; and 652.50±83.10 ng/mL for IgE, respectively. One way ANOVA statistical analysis showed that scopoletin significantly decreased the levels of IL-4, IL-10 and IgE in type I hypersensitive mice. The ability of scopoletin to decrease IL-4 and IgE concentration of type I hypersensitive mice to the normal level was shown by the dose of 10 mg/kg, while the concentration of IL-10 was decreased to the normal level by the dose of 3 mg/kg.

The study concluded that scopoletin isolated from noni fruit could decrease serum levels of IL-4, IL-10 and IgE in type I hypersensitive mice.

Keywords: Noni fruit, Scopoletin, Type I Hypersensitivity, IL-4, IL-10 and IgE.

DAFTAR ISI

KULIT LUAR.....	i
KULIT DALAM	ii
PERSYARATAN GELAR.....	iii
LEMBARAN PENGESAHAN	iv
LEMBARAN PERNYATAAN.....	v
PENETAPAN PANITIA.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
RINGKASAN.....	xii
SUMMARY	xiv
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR TABEL.....	xxii
DAFTAR GAMBAR.....	xxiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xxv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxvii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	6

1.3. Tujuan Penelitian.....	7
1.4. Manfaat Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Sistim Imunitas Tubuh.....	9
2.1.1. Respon Imun Non Spesifik.....	11
2.1.2. Respon Imun Spesifik.....	12
2.1.3. Respon Imun Spesifik Humoral	14
2.1.4. Respon Imun Spesifik Seluler.....	14
2.2. Antigen.....	15
2.3. Immunoglobulin.....	17
2.3.1. Immunoglobulin G.....	19
2.3.2. Immunoglobulin A.....	20
2.3.3. Immunoglobulin M.....	21
2.3.4. Immunoglobulin D.....	21
2.3.4. Immunoglobulin E.....	21
2.4. Reaksi Hipersensitivitas.....	23
2.4.1. Reaksi Hipersensitivitas Tipe I.....	23
2.4.2. Reaksi Hipersensitivitas Tipe II.....	28
2.4.3. Reaksi Hipersensitivitas Tipe III.....	29
2.4.4. Reaksi Hipersensitivitas Tipe IV.....	29
2.5. Sitokin	30
2.5.1. Interleukin 4.....	33
2.5.2. Interleukin 10.....	35
2.6. Mengkudu.....	36
2.6.1. Habitat dan Penyebaran	36
2.6.2. Nama Daerah.....	37
2.6.3. Klasifikasi	38

2.6.4. Morfologi.....	38
2.6.5. Khasiat	40
2.6.6.. Kandungan Kimia.....	43
2.7. Golongan Kumarin.....	45
2.7.1. Struktur dan Biogenesis Golongan Kumarin.....	45
2.7.2. Sinonim Kumarin.....	46
2.7.3. Sifat Kumarin.....	46
2.7.4. Aktivitas Biologis Golongan Kumarin.....	46
2.7.5. Tumbuhan Penghasil Golongan Kumarin	48
2.8. Senyawa Skopoletin.....	49
2.8.1. Struktur Kimia Skopoletin	49
2.8.2. Sinonim Skopoletin	49.
2.8.3. Sifat Skopoletin.....	50
2.8.4. Aktivitas Skopoletin	50
2.8.5. Tanaman Penghasil Skopoletin.....	51
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.....	52
3.1. Kerangka Konseptual.....	52
3.2. Hipotesis Penelitian.....	54
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	55
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	55
4.2. Populasi, Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	56
4.3. Klasifikasi Variabel dan Defenisi Operasional Variabel	57
4.4. Kerangka Operasional Penelitian	59
4.5. Pemantapan Mutu	60
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	62
4.7. Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian	63
4.8. Prosedur dan Pengambilan Data	64

4.9. Persyaratan Etik	69
4.10. Analisa Data	71
BAB V. HASIL PENELITIAN.....	72
5.1. Karakterisasi Serbuk buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	72
5.2. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Skopoletin.....	72
5.3. Pengukuran Kadar IL-4.....	80
5.4. Pengukuran Kadar IL-10	84
5.5. Pengukuran Kadar IgE	88
BAB VI. PEMBAHASAN.....	92
6.1. Karakterisasi Serbuk buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.).....	92
6.2. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Skopoletin.....	94
6.3. Pemilihan dan Sensitisasi Hewan Percobaan.....	97
6.4. . Pengukuran Kadar IL-4.....	101
6.5. Pengukuran Kadar IL-10.....	103
6.6. Pengukuran Kadar IgE	106
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	108
7.1. Kesimpulan	108
7.2. Saran	108
DAFTAR PUSTAKA.....	111
LAMPIRAN.....	121

DAFTAR TABEL

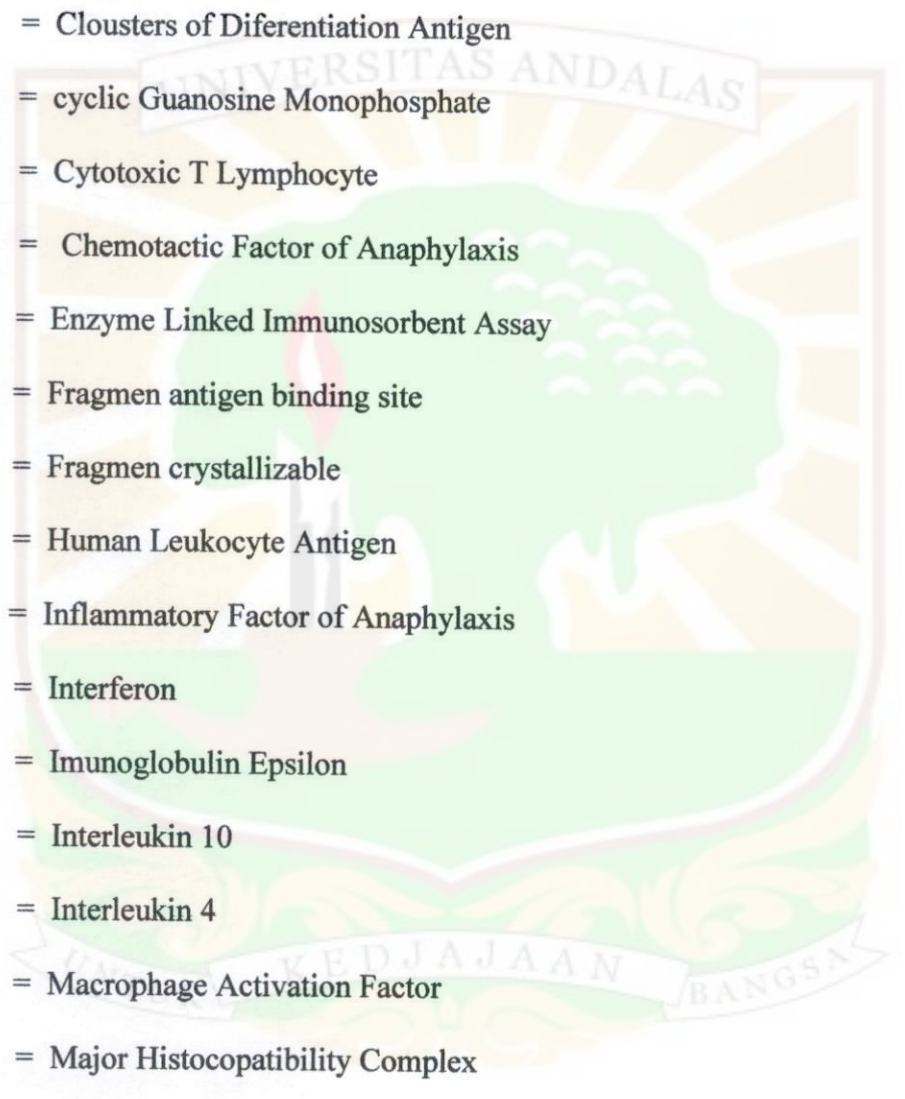
1. Tabel 2.1. Perbedaan Sifat-Sifat Sistem Imun Nonspesifik Dan Spesifik.....	11
2. Tabel 5.1. Panjang Gelombang (λ) Puncak dan Absorban Skopoletin dari Buah Mengkudu dan Skopoletin Pembanding (<i>Extrasynthese</i> , Perancis).	75
3. Tabel 5.2. Bilangan Gelombang (cm^{-1}) dan Gugus Fungsi Skopoletin dari Buah Mengkudu dan Skopoletin Pembanding (<i>Extrasynthese</i> , Perancis).....	77
4. Tabel 5.3. Hasil Pengukuran Luas Area dari Skopoletin Standar (<i>Extrasynthese</i> , Perancis) pada Beberapa Konsentrasi.....	78
5. Tabel.5.4. Kadar IL-4 pada Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Senyawa Skopoletin dari Buah Mengkudu pada Dosis yang Berbeda.....	81
6. Tabel 5.5. Jumlah IL-10 pada Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu.....	86
7. Tabel 5.6. Jumlah IgE dari Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu.....	89

DAFTAR GAMBAR

1. Gambar 2.1. Gambaran Umum Sistem Imun.....	10
2. Gambar 2.2. Struktur Umum Immunoglobulin... ..	19
3. Gambar 2.3. Tipe Reaksi Hipersensitivitas.....	24
4. Gambar 2.4. Proses Degranulasi Sel Mastosit yang Menimbulkan Reaksi Hipersensitivitas Tipe I	26
5. Gambar 2.5. Skema Pelepasan Dan Penghambatan Mediator di dalam Sel Mastosit Dan Sel Basophil.....	27
6. Gambar 2.6. Proses Penginduksian dari Sitokin dan Sifat Kerjanya	30
7. Gambar 2.7. Peranan Interleukin 4 Dalam Memproduksi Antibodi IgE.....	34
8. Gambar 2.8. Peranan Sitokin Dalam Perkembangan Sel T.....	36
9. Gambar 2.9. Tumbuhan Mengkudu (<i>Morinda Citrifolia L.</i>).....	39
10. Gambar 2.9. Struktur Kimia Golongan Kumarin.....	46
11. Gambar 2.10. Bagan Biogenesis Golongan Kumarin.....	47
12. Gambar 2.11. Struktur Molekul Skopoletin.....	49
13. Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.....	52
14. Gambar 5.1. Pola KLT dari Senyawa Skopoletin dan Pembanding dibawah Lampu UV ₃₆₅ nm.....	73
15. Gambar 5.2. Spektrum UV Skopoletin Isolasi dari Buah Mengkudu dan Skopoletin Pembanding (<i>Extrasynthese</i> , Perancis.....	74
16. Gambar 5.4. Spektrum IR Skopoletin Isolasi dari Buah Mengkudu.....	76

17. Gambar 5.5. Spektrum IR Skopoletin Pembanding dari <i>Extrasynthase</i> Perancis.....	76
18. Gambar 5.6. Kurva dari Senyawa Skopoletin Yang Diinjeksikan Sebanyak 20 μ l dengan Eluen Metanol Aquabidest (9:1) Laju Alir 0,5ml/menit Pada Suhu Kamar, Menggunakan Detector Pada Panjang Gelombang 345 nm.....	78
19. Gambar 5.7. Hubungan Antara Konsentrasi Skopoletin Standar Dengan Luas Area.....	79
20. Gambar 5.8. Hubungan Antara Dosis Skopoletin Yang Diberikan Terhadap Kadar IL- 4 dari Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I.....	82
21. Gambar 5.9. Hubungan Antara Dosis Skopoletin Yang Diberikan Terhadap Kadar IL-10 dari Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I.....	87
22. Gambar 5.10. Hubungan Antara Dosis Skopoletin Yang Diberikan Terhadap Jumlah IgE dari Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I.....	90.
23. Gambar 6. Tumbuhan (<i>Morinda citrifolia</i> L.).....	126
24. Gambar 7. Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.).....	126
25. Gambar 8. Kurva standar IL-4 pada panjang gelombang 450 nm.....	137
26. Gambar 9. Kurva standar IL-10 pada panjang gelombang 450 nm.....	140
27. Gambar 10. Kurva standar IgE pada panjang gelombang 450 nm.....	143
28. Gambar 11. Alat spektrofotometer Bio Rad dan komputer pengolahan data.....	150
29. Gambar 12. Alat spektrofotometer Bio Rad dan <i>microwell</i>	150
30. Gambar 13. Mencit Putih Jantan yang Telah Mengalami Reaksi Hipersensitivitas Tipe I.....	151

DAFTAR SINGKATAN



APC	= Antigen Presenting Cell
cAMP	= cyclic Adenosine Monophosphate
CD	= Clousters of Diferentiation Antigen
cGMP	= cyclic Guanosine Monophosphate
CLT	= Cytotoxic T Lymphocyte
ECF-A	= Chemotactic Factor of Anaphylaxis
ELISA	= Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	= Fragmen antigen binding site
Fc	= Fragmen crystallizable
HLA	= Human Leukocyte Antigen
IF-A	= Inflammatory Factor of Anaphylaxis
IFN	= Interferon
IgE	= Immunoglobulin Epsilon
IL-10	= Interleukin 10
IL-4	= Interleukin 4
MAF	= Macrophage Activation Factor
MHC	= Major Histocopatibility Complex
MIF	= Macrophage Inhibitor Factor
NCF-A	= Neutrophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis

NK = Natural Killer

PGE₂ = Prostaglandin E₂

TCR = T Cell Receptor

Th = T helper

TNF- α = Tumor Necrosis Factor- α



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik.....	121
Lampiran 2. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Kebun Tanaman Obat Universitas Andalas.....	122
Lampiran 3. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Laboratorium Sentral Fakultas Farmasi Universitas Andalas.....	123
Lampiran 4. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas....	124
Lampiran 5. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas...	125
Lampiran 6. Tumbuhan dan buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	126
Lampiran 7. Surat Hasil Identifikasi Tanaman Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) dari Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Padang..	127
Lampiran 8. Skema Isolasi Senyawa Skopoletin dari Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	128
Lampiran 9. Hasil Pemeriksaan Susut Pengeringan dari Serbuk Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.).....	129
Lampiran 10. Hasil Pemeriksaan Kadar Abu dari Serbuk Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	130
Lampiran 11. Hasil Pemeriksaan Susut Ukuran Partikel Serbuk Buah Mengkudu.	132
Lampiran 12. Sertifikat Analisis Skopoletin dari Extrasintase Perancis.....	133
Lampiran 13. Perhitungan Linieritas Daerah di bawah Kurva HPLC dari Senyawa Skopoletin.....	135
Lampiran 14. Nilai Absorban dari IL-4 Standar Pada Panjang Gelombang 450 nm.....	136

Lampiran 15. Kurva Standar IL-4 pada Panjang Gelombang 450 nm.....	137
Lampiran 16. Nilai Absorban dari IL-4 Dalam Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu pada Panjang Gelombang 450 nm.....	138
Lampiran 17. Nilai Absorban dari IL-10 Standar pada Panjang Gelombang 450 nm.....	139
Lampiran 18. Kurva Standa IL-10 pada Panjang Gelombang 450 nm.....	140
Lampiran 19. Nilai Absorban dari IL-10 Dalam Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu pada Panjang Gelombang 450 nm.	141
Lampiran 20. Nilai Absorban dari IgE Standar pada Panjang Gelombang 450 nm.	142
Lampiran 21. Gambar Kurva Standar IgE pada Panjang Gelombang 450 nm.....	143
Lampiran 22. Nilai Absorban dari IgE Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu pada Panjang Gelombang 450 nm.....	144
Lampiran 23. Hasil Uji Statistik Analisa Varian Satu Arah Dan Uji Lanjut Bonferroni dan Dari Kadar IL-4, IL-10 dan IgE Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Senyawa Skolpoletin.....	145
Lampiran 24. Hasil Uji Lanjut Bonferroni dan Dari Kadar Il-4, Il-10 dan IgE Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Senyawa Skolpoletin.....	147
Lampiran 25. Gambar alat Spektrofotometer Bio Rad.....	150
Lampiran 26. Gambar Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I.....	151

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Respon imun, baik non spesifik maupun spesifik pada umumnya menguntungkan bagi tubuh, berfungsi protektif terhadap infeksi atau pertumbuhan kanker, tetapi dapat pula menimbulkan hal yang tidak menguntungkan bagi tubuh yaitu berupa penyakit yang disebut reaksi hipersensitivitas. Beberapa komponen yang bekerja pada proteksi sama dengan komponen yang menimbulkan reaksi hipersensitivitas. Hipersensitivitas adalah peningkatan berlebihan reaktivitas atau sensitivitas terhadap antigen yang pernah terpapar atau dikenal sebelumnya. Berdasarkan kecepatan dan mekanisme imun, maka reaksi hipersensitivitas dapat dikelompokkan menjadi 4 tipe, yaitu hipersensitivitas tipe I reaksi anafilaksis, tipe II reaksi sitotoksik, tipe III reaksi kompleks antigen antibodi dan tipe IV reaksi hipersensitivitas tertunda (Abbas and Lichtman, 2004; Bratawidjaja, 2009).

Pencetus reaksi hipersensitivitas tipe I diantaranya protein, serbuk sari, makanan, udara dingin dan kering, debu, asap, binatang, obat, jamur, virus, senyawa kimia hasil industri dan emosional atau stress. Alergen yang masuk dapat menyebabkan berbagai macam reaksi hipersensitivitas tipe I, seperti asma bronkhial, rhinitis alergi, dermatitis atopik, shok anafilaksis dan lain-lain (Kindt et al., 2007; Dipiro, et al., 2008).

Menurut studi The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) yang dilakukan pada anak usia 6-14 tahun di 155 rumah sakit di 58 negara, didapatkan prevalensi asma usia 6-7 tahun berkisar antara 1,6-27,2% dan usia 13-14 tahun sekitar 35,3%. Sedangkan prevalensi dermatitis atopi pada anak usia 6-7 tahun berkisar 0,7-18,4%, dan anak 13-14 tahun berkisar antara 0,6-20,5% (Steering, 2003). Berdasarkan pada penelitian epidemiologi asma bronchial dan alergi selama lima tahun di Jakarta pada tahun 2006, didapatkan prevalensi asma bronchial adalah 13,9% dan prevalensinya meningkat menjadi 23%. Demikian pula halnya dengan prevalensi penyakit rinitis alergi yang meningkat dari 9% menjadi 12,3%, dan penyakit dermatitis atopi meningkat dari 4% menjadi 24,6% (Helmy dan Munasir, 2007).

Reaksi hipersensitivitas tipe I dalam tubuh merupakan reaksi imunologik terhadap alergen secara berlebihan pada seseorang yang sebelumnya pernah terpapar dengan alergen yang sama. Masuknya alergen ke dalam tubuh menimbulkan respon imun dengan dibentuknya IgE dan selanjutnya IgE tersebut terikat pada permukaan sel mast dan sel basofil (Robinson, et.al., 2004; Bellavite, 2006). Proses pemaparan alergen dimulai dengan proses fagositosis oleh sel makrofag. Sel makrofag akan memecah menjadi peptide-peptida dan selanjutnya peptida ini diikat oleh molekul MHC kelas II dan dibawa menuju permukaan sel makrofag tersebut dan selanjutnya dipresentasikan ke sel T *helper naif* (Tho). Sel makrofag akan melepaskan interleukin-1 (IL-1), IL-12 dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). IL-1 dan IL-12 terikat pada sel Tho dan sel Tho akan berdiferensiasi menjadi sel Th2. Alergen yang masuk juga diproses oleh sel mast dan sel

basophil sehingga sel ini melepaskan IL-4. Tingginya kadar IL-4 di dalam jaringan maka proliferasi dan diferensiasi sel Th menjadi sel Th2 semakin tinggi. Sel Th2 yang terbentuk akan melepaskan beberapa sitokin seperti IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13 (Burtis, et al., 2006). IL-4 mempunyai efek langsung pada sel limposit B dan sel ini berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi sel plasma, yang selanjutnya menghasilkan IgE (Karlsson, et al., 2004; Maizels, 2005). IL-10 yang dihasilkan oleh sel Th2 dapat menghambat produksi sitokin inflamasi yang dihasilkan oleh sel Th1 (Kearley, et al., 2005).

Masuknya allergen untuk kedua kalinya, akan berikatan dengan IgE yang sudah terikat pada permukaan sel mast dan sel basophil. Ikatan ini akan memicu aktivitas enzimatik pada membran sel tersebut dan selanjutnya terjadi pelepasan mediator kimia. Mediator utama yang dilepaskan adalah histamin, *Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis* (ECF-A) dan *Neutrophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis* (NCF-A). Histamin yang dilepaskan menimbulkan bentolan warna kemerahan pada kulit, peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan kontraksi otot polos (Janeway, 2001; Abbas, et al., 2004; Bochner and Busse, et al., 2005; Subowo, 2010).

Untuk mengatasi reaksi hipersensitivitas tipe I tersebut dapat dilakukan beberapa cara diantaranya; mencegah kontak dengan antigen, menggunakan obat anti histamin, menghambat produksi IgE dengan obat yang bekerja sebagai immunosupresan, selain itu juga dapat dilakukan dengan menghambat terjadinya degranulasi sel mast sehingga tidak terjadi pelepasan mediatornya (Moon, et al., 2007; Kim, et al., 2004). Metoda lain juga dapat dilakukan dengan mengikat IgE

yang diproduksi dengan antibodi terhadap IgE (antibodi-IgE) (Price and Hamilton, 2007). Obat yang digunakan untuk menghambat reaksi hipersensitivitas tipe I memberikan berbagai macam efek samping, seperti antihistamin dapat menyebabkan sedatif (rasa kantuk), gangguan saluran cerna (sembelit dan retensi kemih), efek antikolinergik (mulut kering, gelisah, dan lain-lain). Pemberian antiinflamasi seperti prednison menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah, retensi natrium dalam tubuh, tukak lambung dan lain-lain. Pemberian bronkodilator pada penyakit asma memiliki efek samping seperti palpitasi, tremor, vasodilasi peripheral dan lain-lain (Tjay, et al., 2002; Dipiro, 2008; Sukandar, 2011).

Munculnya efek yang tidak diharapkan akibat pemakaian obat yang berasal dari bahan kimia untuk pengobatan hipersensitivitas tipe I, maka orang mulai beralih pada penggunaan tanaman obat. Salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat reaksi hipersensitivitas tipe I adalah buah mengkudu atau buah noni (Bangun, 2005). Penggunaan tumbuhan sebagai obat harus ditunjang dengan penelitian secara ilmiah sehingga kebenaran khasiatnya dapat dibuktikan (Winarti, 2005).

Buah mengkudu mengandung senyawa neolignan dan americanin-A yang aktif sebagai antioksidan (Zin, et al., 2002; Su, et al., 2005). Aktivitas lain dari senyawa ini telah dilaporkan sebagai antitumor pada tikus (Hirazumi and Furusawa, 1999), antikanker pada paru tikus (Wang, et al., 2003). Buah mengkudu juga mengandung polisakarida yang disebut dengan noni. Polisakarida ini mempunyai efek menghambat motilitas gastrointestinal, menghambat

gastritis dan hipoglikemia pada tikus serta menghambat factor pertumbuhan tumor paru mencit (Furusawa, et al., 2003). Ekstrak buah mengkudu mempunyai efek hepatoprotektor, yaitu dengan menurunkan enzim aspartat transaminase (AST) dan enzim alanin transaminase (ALT) yang diinduksi dengan parasetamol pada mencit (Sudjarwo, 2004). Endapan polisakarida dapat menstimulasi TNF pada tikus dan IL-1 pada mencit (Hokama, 1993). Aktivitas sebagai antitumor, ekstrak buah dapat meningkatkan penghambatan dan penghancuran khusus oleh sel makrofag dan sel natural killer (NK). Sebagai anti-inflamasi, ekstrak buah mengkudu dapat menghambat enzim *cyclooxygenase 1* (COX1), *cyclooxygenase 2* (COX2), IL1 β , IL6, TNF α , dan enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Hirazumi, et al., 1999; Hornick, et.al., 2003). Selain itu buah mengkudu juga telah digunakan orang sebagai antibakteri, antiviral, antitumor, antihelmentik, analgetik, hipotensi, anti-inflamasi dan meningkatkan ketahanan tubuh (Wang, et al., 2000), menghambat pertumbuhan kanker mammae pada mencit yang diinduksi dengan DMBA (Wang, et al., 2003) menekan pertumbuhan sel tumor (Jayaraman, et al., 2008), anti-ulcer (Muralidharan and Srikanth, 2009).

Hasil penelitian yang telah dilakukan khusus terhadap reaksi hipersensitivitas ternyata ekstrak etanol buah mengkudu dapat menghambat reaksi dermatitis pada kulit mencit putih hipersensitif yang diinduksi dengan albumin (Aldi, dkk., 2003) dan secara in-vitro dapat menghambat degranulasi mastosit tersensitisasi yang diinduksi dengan albumin (Aldi, dkk., 2006). Pada pemakaian topikal ekstrak etanol menekan reaksi inflamasi (Aldi, dkk., 2007). Penelitian terakhir juga diketahui ekstrak etanol buah mengkudu dapat

meningkatkan titer antibodi mencit putih jantan yang diinduksi dengan sel darah merah kambing dan dapat meningkatkan jumlah sel limfosit, neutrofil batang dan sel eosinofil (Aldi, dkk., 2007).

Salah satu zat aktif yang terdapat didalam ekstrak etanol buah mengkudu adalah skopoletin. Jumlah skopoletin dalam buah mengkudu tidak kurang dari 0,02% (Anonim, 2004; Depkes, 2008). Penelitian terakhir juga disebutkan bahwa skopoletin dapat menghambat degranulasi mastosit mencit (Moon, et al., 2006). Disamping itu dilaporkan juga bahwa skopoletin dapat menghambat produksi *prostaglandin* E₂ (PGE₂), TNF- α , IL-1 β , IL-6 dan menekan COX-2 (Hyung, et al., 2006).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh senyawa skopoletin dari ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap IL4, IL-10 dan antibodi IgE pada mencit putih jantan yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah ada pengaruh skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IL-4 mencit hipersensitivitas tipe I ?
2. Apakah ada pengaruh skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IL-10 mencit hipersensitivitas tipe I ?
2. Apakah ada pengaruh skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IgE mencit hipersensitivitas tipe I ?

I.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum :

Membuktikan pengaruh senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IL-4, IL-10 dan IgE pada mencit hipersensitivitas tipe I.

1.3.2. Tujuan Khusus :

1. Membuktikan ada pengaruh skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IL-4 mencit hipersensitivitas tipe I.
2. Membuktikan ada pengaruh skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IL-10 mencit hipersensitivitas tipe I.
3. Membuktikan ada pengaruh skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IgE mencit hipersensitivitas tipe I .

1.4. Manfaat Penelitian

1. Setelah dilakukan penelitian tentang pengaruh senyawa skopoletin dari buah mengkudu terhadap IL-4, IL-10 dan IgE pada mencit hipersensitivitas tipe I maka dapat memberikan informasi baru dalam memahami peranan senyawa skopoletin dalam menekan reaksi hipersensitivitas tipe I serta memberi wawasan baru dalam pengembangan penelitian lebih lanjut pada pengobatan reaksi hipersensitivitas tipe I.

2. Diharapkan pada para klinisi untuk dapat menggunakan senyawa skopoletin sebagai obat reaksi hipersensitivitas tipe I.
3. Terungkapnya senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu dapat menurunkan kadar IL-4, IL-10 dan IgE pada mencit hipersensitivitas tipe I, maka akan memberi pengetahuan kepada masyarakat bahwa buah mengkudu dapat digunakan untuk pengobatan penyakit reaksi hipersensitivitas tipe I.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

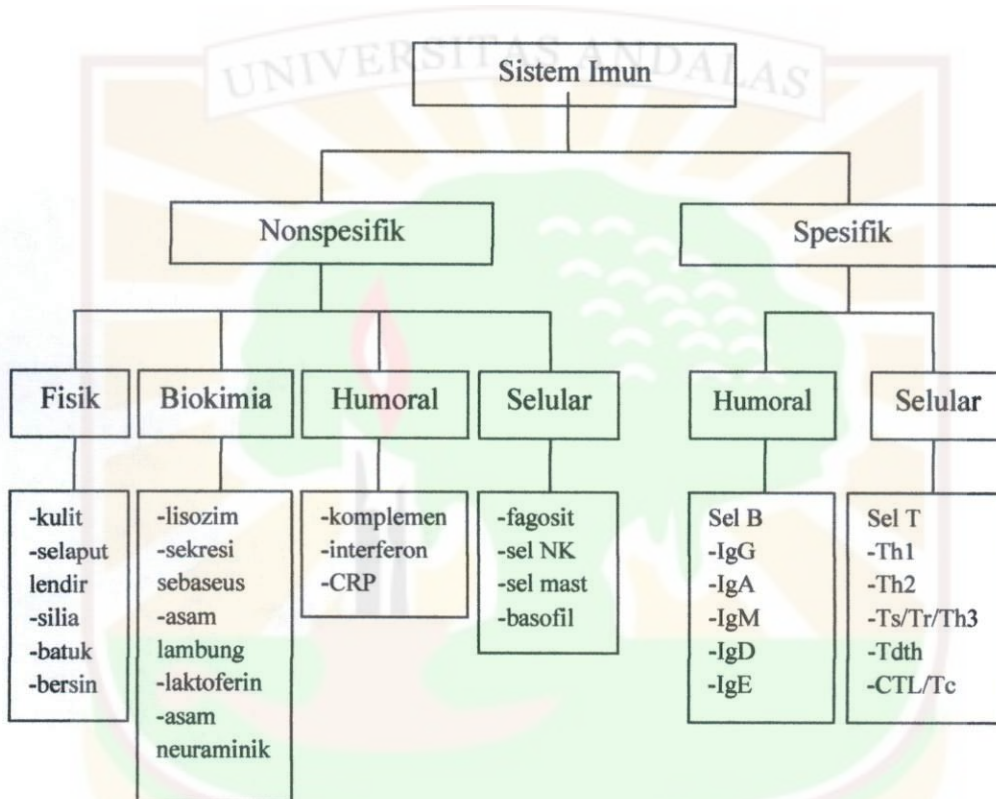
2.1. Sistem Imunitas Tubuh

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan tubuh untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Respon imun sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenali molekul asing (antigen) yang bersifat patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan sumber antigen bersangkutan. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup (Bratawidjaja, 2009).

Proses pengenalan antigen dilakukan oleh unsur utama sistem imun, yaitu limfosit, yang kemudian diikuti oleh fase efektor yang melibatkan berbagai jenis sel. Pengenalan antigen sangat penting dalam fungsi sistem imun normal, karena limfosit harus mengenal semua antigen pada patogen potensial dan pada saat yang sama harus mengabaikan molekul-molekul jaringan tubuh sendiri (toleransi). Untuk mengatasi hal tersebut limfosit pada seorang individu melakukan diversifikasi selama perkembangannya sedemikian rupa sehingga populasi limfosit secara keseluruhan mampu mengenal molekul asing dan membedakannya dari molekul jaringan atau sel tubuh sendiri (Kresno, 2003).

Selama perkembangannya sistem imun mengalami diversifikasi sehingga mampu mengenal molekul asing (*non-self*) dan membedakannya dari

molekul jaringan atau sel tubuh sendiri (*self*). Kemampuan diversifikasi dimiliki oleh komponen sistem imun yang terdapat dalam jaringan limforetikuler yang letaknya tersebar di seluruh tubuh, misalnya di dalam sumsum tulang, kelenjar limfe, limpa, timus, sistem saluran nafas, saluran cerna, dan organ-organ lain.



Gambar 2.1. Gambaran Umum Sistem Imun (Bratawidjaya, 2009)

Bila sistem imun terpapar pada zat yang dianggap asing, maka ada dua jenis respon imun yang mungkin terjadi, yaitu respon imun nonspesifik dan respon imun spesifik (Gambar 2.1) (Bratawidjaya, 2009).

Table 2.1. Perbedaan Sifat-Sifat Sistem Imun Nonspesifik dan Spesifik
(Bratawidjaja, 2009)

	Nonspesifik	Spesifik
Resistensi	Tidak berubah oleh infeksi	Membaik oleh infeksi berulang (memori)
Spesifitas	Umumnya efektif terhadap semua mikroba	Spesifik untuk mikroba yang sudah mensensitasi sebelumnya
Sel yang penting	Fagosit Sel NK Sel mast Eosinofil	Th, Tdth, Tc, Ts Sel B
Molekul yang penting	Lisozim Komplemen APP Interferon CRP Kolektin Molekul adhesi	Antibody Sitokin Mediator Molekul adhesi

2.1.1 Respon Imun Nonspesifik

Respon imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*) dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar pada zat tersebut (Kresno, 2003).

Mekanisme fisiologis imunitas nonspesifik berupa komponen normal tubuh yang selalu ditemukan pada individu sehat dan siap mencegah mikroba

masuk ke dalam tubuh dan dengan cepat menyingkirkan mikroba tersebut. Disebut nonspesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Mekanismenya tidak menunjukkan spesifitas terhadap bahan asing dan mampu melindungi tubuh terhadap banyak patogen potensial. Sistem tersebut merupakan pertahanan terdepan dalam dalam menghadapi serangan berbagai mikroba dan dapat memberikan respon langsung (Baratawidjaja, 2009).

Komponen-komponen utama sistem imun nonspesifik adalah pertahanan fisik dan kimiawi seperti epitel dan substansi antimikroba yang diproduksi pada permukaan epitel, berbagai jenis protein dalam darah termasuk diantaranya komponen-komponen sistim komplemen, mediator inflamasi lainnya dan berbagai sitokin, sel-sel fagosit yaitu sel-sel polimorfonuklear dan makrofag serta sel natural killer (NK). Salah satu upaya tubuh untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen, misalnya antigen bakteri, adalah menghancurkan bakteri bersangkutan secara nonspesifik dalam proses fagositosis, tanpa memperdulikan perbedaan-perbedaan kecil yang ada di antara substansi-substansi asing tersebut. Selain fagositosis, manifestasi respon imun nonspesifik yang lain adalah reaksi inflamasi (Kresno, 2003; Kindt, et al., 2007).

2.1.2. Respon Imun Spesifik

Respon imun spesifik merupakan respon yang didapat (*acquired*) yang timbul terhadap antigen tertentu, terhadap tubuh yang pernah terpapar antigen

tersebut sebelumnya. Ciri utama sistem imun spesifik (Kresno, 2003; Baratawidjaja, 2006) adalah :

1. Spesifitas, artinya respon yang timbul terhadap antigen bahkan terhadap komponen struktural kompleks protein atau polisakarida yang berbeda tidak sama, bagian dari antigen tersebut yang dikenal oleh limfosit disebut determinan antigen atau epitop. Spesifitas ini terjadi karena masing-masing limfosit mengekspresikan reseptor yang mampu membedakan struktur antigen satu dengan lain walaupun perbedaan itu sangat kecil.
2. Diversitas, artinya jumlah total spesifitas limfosit terhadap antigen dalam satu individu yang disebut *lymphocyte repertoire*, sangat besar. Diduga, sistem imun mamalia dapat membedakan sedikitnya 10^9 antigen yang berbeda. Hal ini dimungkinkan karena limfosit memiliki reseptor terhadap antigen dengan struktur yang berbeda-beda, tergantung pada antigen yang dikenalnya.
3. Memori, limfosit memiliki kemampuan mengingat antigen yang pernah dijumpainya dan memberikan respon yang lebih efektif pada perjumpaan berikutnya.
4. Spesialisasi, artinya sistem imun memberikan respon yang berbeda dengan cara yang berbeda terhadap berbagai mikroba yang berlainan.
5. Membatasi diri (*self limitation*), dalam artian semua respon normal mereda dalam waktu tertentu setelah rangsangan antigen.
6. Membedakan *self* dari *non-self*, artinya sistem imun menunjukkan toleransi terhadap antigen tubuh sendiri. Hal ini dimungkinkan karena limfosit-

limfosit yang memiliki reseptor terhadap antigen jaringan tubuh sendiri (limfosit autoreaktif) telah disingkirkan pada saat perkembangan.

Untuk menghancurkan benda asing yang berbahaya bagi tubuh, sistem imun spesifik dapat bekerja tanpa bantuan sistem imun nonspesifik. Pada umumnya terjalin kerja sama yang baik antara antibodi-komplemen-fagosit dan antara sel T-makrofag (Kresno, 2003; Baratawidjaja, 2009).

2.1.3 Sistem Imun Spesifik Humoral

Dalam sistem imun spesifik humoral yang berperan adalah limfosit B atau disebut juga dengan sel B, yang berasal dari sel asal multipoten. Bila sel B dirangsang oleh benda asing maka sel tersebut akan berproliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang dapat membentuk antibodi yang berfungsi sebagai pertahanan terhadap infeksi virus, bakteri ekstraselular dan menetralkan toksinnya (Kindt, et al., 2007).

2.1.4 Sistem Imun Spesifik Selular

Dalam sistem imun spesifik selular yang berperan adalah limfosit T atau disebut juga sel T. Sel T ini berasal dari sel yang sama seperti sel B. Pada orang dewasa sel T dibentuk di dalam sumsum tulang tetapi proliferasi dan diferensiasinya terjadi di dalam kelenjar timus. Fungsi utama sistem imun spesifik selular adalah untuk pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler, virus, jamur, parasit dan tumor (Kindt, et al., 2007).

2.2. Antigen

Antigen adalah molekul yang dapat merangsang pembentukan antibodi atau substansi yang mampu bereaksi dengan antibodi yang diproduksi atas rangsangan imunogen, tanpa mempertimbangkan apakah antigen tersebut bersifat imunogenik. Imunogen adalah suatu bahan yang dapat membangkitkan respon imun, sehingga dihasilkan antibodi atau sel T sitotoksik. Ini berarti bahwa semua imunogen adalah antigen, tetapi tidak semua antigen merupakan imunogen (Kresno, 2003).

Sel sistem imun tidak berinteraksi dengan atau mengenal seluruh molekul imunogen, tetapi limfosit mengenal tempat khusus pada makromolekul yang disebut epitop atau gugus determinan antigen. Sel B dan sel T mengenal berbagai epitope pada molekul antigen yang sama. Limfosit juga dapat berinteraksi dengan antigen yang kompleks pada berbagai tahap struktur antigen. Oleh karena sel B mengikat antigen yang bebas dalam larutan, epitope yang dikenalnya cenderung mudah ditemukan di permukaan imunogen. Pada sel T epitop yang dikenal berupa peptide yang merupakan hasil cerna dari protein yang diikat oleh molekul MHC dan membentuk kompleks pada reseptor permukaan sel T (TCR) (Baratawidjaja, 2009).

Epitop atau determinan antigen adalah bagian dari antigen yang dapat membuat kontak fisik dengan reseptor antibodi, menginduksi pembentukan antibodi yang dapat diikat spesifik oleh bagian dari antibodi atau oleh reseptor antibodi. Makromolekul dapat memiliki berbagai epitop yang masing-masing merangsang produksi antibodi spesifik yang berbeda. Paratop ialah bagian dari

antibodi yang mengikat epitope atau TCR yang mengikat epitope pada antigen. Respon imun dapat terjadi terhadap semua golongan bahan kimia seperti karbohidrat, protein dan asam nukleat (Baratawidjaja, 2009).

Antigen dapat dibagi menurut epitop, spesifisitas, ketergantungan terhadap sel T dan sifat kimianya (Baratawidjaja, 2009).

Berdasarkan epitope, maka antigen dapat dikelompokkan menjadi :

- a. Unideterminan univalen, yaitu satu molekul antigen memiliki hanya satu jenis determinan antigen atau epitop.
- b. Unideterminan multivalen, yaitu satu molekul antigen memiliki satu jenis determinan antigen atau epitop tapi jumlahnya lebih dari satu.
- c. Multideterminan univalen, yaitu satu molekul antigen memiliki lebih dari satu jenis determinan antigen atau epitop tapi jumlahnya hanya satu tiap jenis tersebut.
- d. Multideterminan multivalen, yaitu satu molekul antigen memiliki lebih dari satu jenis determinan antigen atau epitop dan jumlahnya tiap jenis tersebut juga lebih dari satu.

Menurut spesifisitasnya, maka antigen dapat dikelompokkan menjadi :

- a. Heteroantigen, yaitu antigen yang dimiliki oleh banyak spesies.
- b. Xenoantigen, yaitu antigen yang hanya dimiliki oleh spesies tertentu.
- c. Alloantigen (isoantigen), yaitu antigen yang spesifik untuk individu dalam satu spesies.
- d. Antigen organ spesifik, yaitu antigen yang hanya dimiliki organ tertentu.
- e. Autoantigen, yaitu antigen yang dimiliki oleh alat tubuh tertentu.

Pembagian antigen berdasarkan ketergantungan terhadap sel T, adalah:

- a. T Dependen, yaitu antigen yang memerlukan pengenalan oleh sel T terlebih dahulu untuk dapat menimbulkan respon antibodi. Kebanyakan antigen protein termasuk dalam golongan ini.
- b. T Independen, yaitu antigen yang dapat merangsang sel B tanpa bantuan sel T untuk membentuk antibodi.

Imunogen yang paling poten umumnya merupakan makromolekul protein, polisakarida, polipeptida atau dapat juga berupa polimer sintetik misalnya polivinilpirolidin (PVP). Faktor faktor yang mempengaruhi imunogenitas suatu substansi adalah (Baratawidjaja, 2009), yaitu :

1. Keasingan dari suatu substansi tersebut.
2. Berat molekul dari substansi tersebut.
3. Susunan molekul dari substansi.
4. Cara masuknya substansi tersebut ke dalam tubuh.
5. Faktor genetik.

2.3. Imunoglobulin

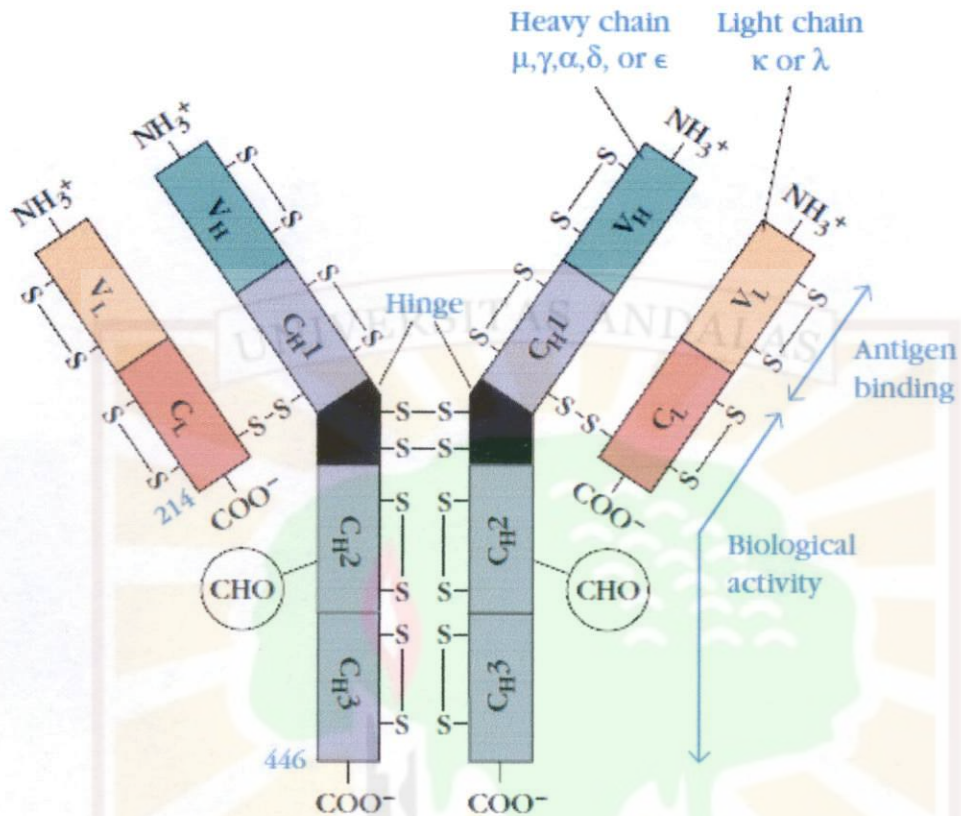
Imunoglobulin atau disebut juga antibodi merupakan suatu jenis protein yang dihasilkan oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat masuknya antigen dan dapat bereaksi dengan antigen tersebut. Imunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi. Molekul ini disintesis oleh sel B dalam 2 bentuk yang berbeda, yaitu sebagai reseptor

permukaan (untuk mengikat antigen), dan sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraselular (Kresno, 2003).

Struktur dasar immunoglobulin terdiri dari 2 rantai berat (*H-chain*) yang identik dan 2 rantai ringan (*L-chain*) yang juga identik. Setiap rantai terikat pada rantai berat melalui ikatan disulfida (S-S), demikian pula rantai berat satu dengan yang lain diikat dengan ikatan S-S. Molekul ini oleh enzim proteolitik papain dapat dipecah menjadi 3 fragmen, yaitu 2 fragmen yang mempunyai susunan sama terdiri atas H-chain dan L-chain, disebut fragmen Fab dan 1 fragmen yang hanya terdiri atas H-chain saja disebut fragmen Fc (Gambar 2.3) (Kresno, 2003).

Fragmen Fab (*fragmen antigen binding site*), berfungsi mengikat antigen, susunan asam amino di bagian ini berbeda antara molekul immunoglobulin yang satu dengan yang lain dan sangat variable sesuai dengan variabilitas antigen yang merangsang pembentukannya. Sebaliknya fragmen Fc (*fragmen crystallizable*) tidak mempunyai kemampuan mengikat antigen, mempunyai fungsi efektor sekunder dan menentukan sifat sifat biologik immunoglobulin bersangkutan (Kresno, 2003; Baratawidjaja, 2009).

Dikenal 5 kelas utama immunoglobulin dalam serum manusia, klasifikasi ini didasarkan atas perbedaan dalam struktur kimia yang mengakibatkan perbedaan dalam sifat biologik maupun sifat fisika immunoglobulin, yaitu IgG, IgM, IgA, IgD dan IgE (Baratawidjaja, 2009).



Gambar 2.2. Struktur Umum Immunoglobulin (Kindt, et al., 2007)

Keterangan : V_H bagian variable rantai berat, C_H bagian konstan rantai berat, V_L bagian variable rantain ringan, C_L bagian konstan rantai ringan, -S-S- ikatan disulfide.

2.3.1. Immunoglobulin G (IgG)

IgG merupakan komponen utama immunoglobulin serum, dengan berat molekul 160.000 Dalton, memiliki rantai berat γ (G). Kadarnya dalam serum sekitar 13 mg/ml, merupakan 75% dari immunoglobulin total. Ditemukan dalam berbagai cairan seperti darah, CSS, dan juga urin. Immunoglobulin dapat menembus plasenta ke janin dan berperan pada imunitas bayi sampai umur 6-9

bulan, IgG dan komplemen bekerja saling membantu sebagai opsonin pada pemusnahan antigen karena memiliki sifat opsonin yang aktif.

IgG juga berperan pada imunitas selular karena merusak antigen sel melalui interaksi dengan sistem komplemen atau melalui efek sitolitik sel K, eosinofil, netrofil yang semuanya memiliki reseptor Fc dari IgG.

IgG merupakan immunoglobulin terbanyak dalam darah, SSP dan peritoneal. IgG pada manusia terdiri atas 4 subkelas yaitu IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4 yang berbeda dalam sifat dan aktivitas biologik (Bratawidjaja, 2009).

2.3.2. Immunoglobulin A (IgA)

Immunoglobulin kedua terbanyak dalam serum adalah IgA. Memiliki berat molekul 165.000 Dalton dan rantai beratnya adalah α (A). Kadarnya terbanyak ditemukan dalam cairan sekresi saluran nafas, cerna dan kemih, air mata, keringat, ludah dan dalam air susu lebih tinggi dalam bentuk IgA sekretori (sIgA) yang merupakan bagian terbanyak.

IgA dalam serum dapat mengaglutinasi dan mengganggu motilitas kuman sehingga memudahkan fagositosis. IgA dapat pula meningkatkan fungsi sel polimorfonuklear (opsonisasi) karena sel tersebut memiliki reseptor Fc dari IgA. sIgA dapat mencegah kontak antara mikroorganisme dengan selaput lendir, sehingga mikroba tidak dapat menembus dan berkembang biak didalam badan. IgA juga dapat menetralsasi toksin atau virus, IgA dalam serum dapat mengaglutinasi kuman (Bratawidjaja, 2009).

2.3.3 Immunoglobulin M (IgM)

IgM adalah antibodi pertama yang dibentuk dalam respon imun. Nama M berasal dari macroglobulin dan berat memiliki berat molekul 900.000 dalton. IgM memiliki mempunyai rumus bangun pentamer dengan rantai beratnya adalah μ (M) dan merupakan immunoglobulin terbesar. IgM terutama terdapat di intravaskular dan merupakan 10% dari immunoglobulin total. IgM juga merupakan Ig yang predominan diproduksi janin. Janin umur 12 minggu sudah mulai membentuk IgM bila sel B nya dirangsang oleh infeksi intrauterin, seperti sifilis kongenital, rubella, toksoplasmosis dan virus sitomegalo. Kadar IgM anak akan mencapai kadar IgM dewasa pada usia satu tahun (Bratawidjaja, 2009).

2.3.4 Immunoglobulin D (IgD)

Ig D ditemukan dalam serum dengan kadar yang sangat rendah, sekitar 1% dari total immunoglobulin. IgD memiliki rantai δ (D). peran biologisnya sebagai antibodi humoral belum jelas, yang telah diketahui adalah perannya sebagai antibodi dalam reaksi hipersensitifitas terhadap penisilin. IgD diduga merupakan reseptor antigen pertama pada permukaan sel B dan berperan dalam mengawali respon imun (Bratawidjaja, 2009).

2.3.5 Immunoglobulin E (IgE)

Immunoglobulin E dapat dijumpai dalam serum dengan kadar amat rendah, hanya 0,0004% saja dari kadar immunoglobulin total. IgE dapat dijumpai dalam cairan sekresi. Salah satu sifat penting dari IgE adalah kemampuannya

melekat secara erat pada permukaan mastosit dan basofil melalui reseptor Fc (Fcε-R). IgE dibentuk oleh sel plasma dalam selaput lendir saluran nafas dan cerna. Bila sel yang dilapisi IgE ini terpapar alergen, sel-sel tersebut melepaskan mediator reaksi hipersensitifitas yang sangat poten, diantaranya histamin, SRS-A dan ECF-A, sehingga menimbulkan gejala alergi (Kresno, 2003). Alergen yang diikat dua molekul IgE ini pada permukaan sel mast (*cross-linking*) akan menimbulkan influks ion kalsium ke dalam sel. Hal ini menurunkan kadar adenosin monofosfat (cAMP) intraselular yang menimbulkan degranulasi mastosit.

IgE dikenal sebagai reagin pada reaksi hipersensitifitas tipe segera (*immediate type*), misalnya pada rhinitis musiman, asma, urtikaria, dan reaksi anafilaktik. Selain pada alergi, kadar IgE yang tinggi ditemukan pada infeksi cacing, dan diduga berperan dalam imunitas terhadap parasit. Akhir akhir ini terungkap bahwa parasit yang dilapisi oleh IgE lebih mudah dibunuh oleh eosinofil, akan tetapi peran IgE disini tidak sama dengan peran opsonisasi IgG. IgE akan diikat oleh reseptor Fc IgE pada permukaan sel mastosit, kemudian mediator-mediator yang dilepaskan oleh mastosit atas rangsangan IgE menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler serta pelepasan ECF-A, merangsang pelepasan PAF (platelet activating factor) dan eosinofil peroksidase yang diperlukan untuk menghancurkan parasit (Kresno, 2003).

Kadar IgE pada individu atopik lebih tinggi dibandingkan individu normal, dan kadar IgE spesifik terhadap antigen tertentu juga meningkat sesuai dengan kepekaan orang bersangkutan terhadap alergen yang relevan. Sel plasma

yang memproduksi IgE terdapat di dalam tonsil, sinusoid dan pada jaringan limfoid sepanjang mukosa saluran nafas dan saluran cerna (Kresno, 2003).

2.4. Reaksi Hipersensitivitas

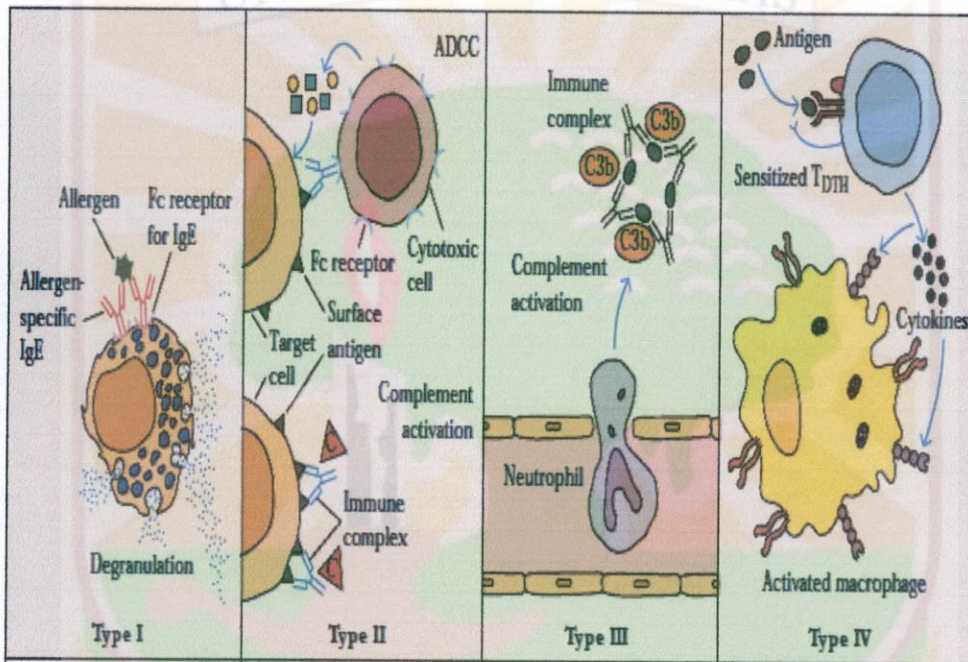
Hipersensitivitas adalah respon imun berlebihan dan yang tidak diinginkan karena dapat menimbulkan kerusakan jaringan tubuh. Reaksi tersebut oleh Gell dan Coombs dibagi dalam 4 tipe reaksi menurut kecepatannya dan mekanisme imun yang terjadi. Reaksi ini dapat terjadi sendiri-sendiri, tetapi di dalam klinik dua atau lebih jenis reaksi tersebut sering terjadi bersamaan (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009).

2.4.1. Reaksi Hipersensitivitas Tipe I

Reaksi hipersensitivitas tipe I disebut juga reaksi cepat, reaksi anafilaksis atau reaksi alergi dan dikenal sebagai reaksi yang segera timbul sesudah alergen masuk ke tubuh. Pemaparan antigen yang pada hakekatnya tidak berbahaya untuk pertama kali, tidak menimbulkan reaksi yang merugikan. Tetapi pemaparan berikutnya dapat menimbulkan reaksi lokal maupun sistemik yang kadang-kadang demikian hebat dan membahayakan seperti yang terjadi pada renjatan anafilaksis (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009).

Reaksi ini terjadi segera setelah tubuh terpapar oleh antigen. Istilah alergi pertama kali digunakan oleh Von Pirquet pada tahun 1906, diartikan sebagai “reaksi penjamu yang berubah” bila terpapar dengan bahan yang sama untuk kedua kalinya. Urutan kejadian reaksi hipersensitivitas ini adalah (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009). :

1. Fase sensitasi, yaitu waktu yang dibutuhkan untuk membentuk IgE sampai diikatnya oleh reseptor spesifik pada permukaan sel mastosit dan sel basofil.
2. Fase aktivasi, yaitu waktu selama terjadinya pajanan ulang dengan alergen yang spesifik, mastosit melepaskan isinya yang berisikan granul yang menimbulkan reaksi.



Gambar 2.3. Tipe Reaksi Hipersensitivitas (Kindt, et al., 2007).

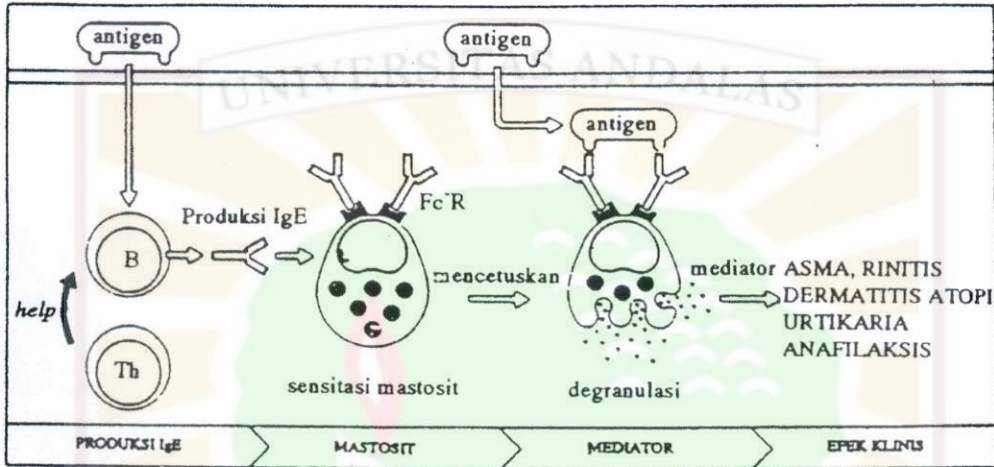
3. Fase efektor, yaitu waktu terjadinya respon yang kompleks sebagai efek bahan-bahan yang dilepas sel mastosit dan sel basofil.

Masuknya alergen ke dalam tubuh menimbulkan respon imun dengan dibentuknya IgE untuk alergen tersebut. Selanjutnya IgE yang dihasilkan oleh sel plasma tersebut masuk dalam sirkulasi dan berikatan pada permukaan sel mastosit dan basofil, sebab sel tersebut memiliki reseptor terhadap Fc IgE

tersebut. Bila tubuh terpapar oleh alergen yang sama untuk kedua kalinya maka IgE yang terikat pada sel mastosit dan basofil akan mengikat alergen tersebut. Ikatan ini dapat memicu aktivitas enzimatik dalam membran sel mastosit dan basofil yang akhirnya terjadi pelepasan mediator-mediator kimia yang tersimpan dalam bentuk granula dan mediator inilah yang bertanggung jawab terhadap timbulnya reaksi hipersensitivitas tipe I, seperti penyakit asma bronkhial, rinitis alergi, dermatitis atopik dan urtikaria serta syok anafilaksis (Gambar 2.4). Ada 3 kelompok mediator yang akan dilepaskan. Mediator pertama diantaranya adalah histamin, *Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis* (ECF-A) untuk sel-sel eosinofil dan *Neutrophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis* (NCF-A) untuk sel-sel netrofil. Histamin yang dilepaskan menyebabkan bintil dan warna kemerahan pada kulit disamping pengaruh lain seperti peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan kontraksi otot polos.

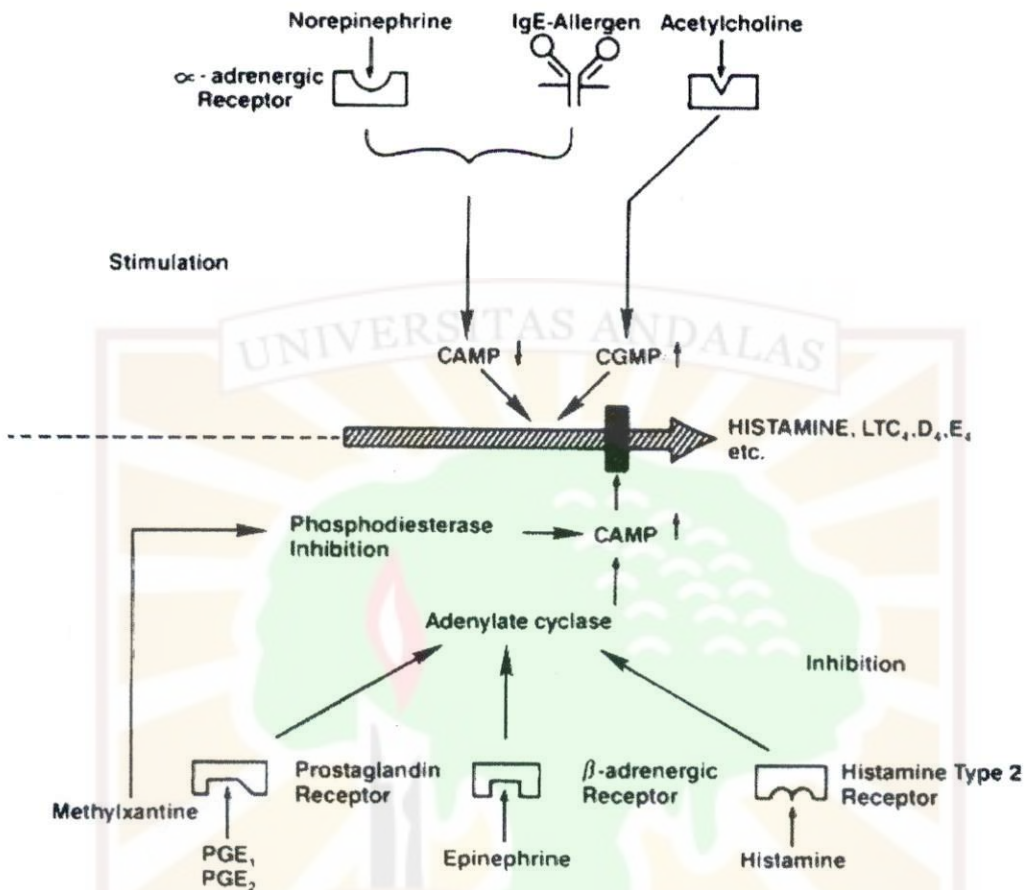
Mediator kedua adalah mediator yang dihasilkan secara tidak langsung melalui pelepasan asam arakhidonat dari molekul fosfolipid membran. Asam arakhidonat merupakan substrat pembentuk enzim siklooksigenase dan lipooksigenase. Aktivitas enzim siklooksigenase menghasilkan prostaglandin dan tromboksan yang dapat menyebabkan radang dan penebalan tonus pembuluh darah. Enzim lipooksigenase akan menghasilkan leukotrien. Mediator ketiga yang dilepaskan adalah heparin, kemotripsin dan *Inflammatory Factor of Anaphylaxis* (IF-A) yang memberikan pengaruh terhadap jaringan lebih lama. Lepasnya mediator tersebut akan menghasilkan berbagai manifestasi reaksi, yaitu kontraksi otot polos, vasodilatasi pembuluh darah, meningkatnya permeabilitas pembuluh darah kapiler serta terjadinya penurunan tekanan darah yang

mengakibatkan reaksi hipersensitivitas tipe I dan secara klinis akan menimbulkan penyakit seperti asma bronkhial, rinitis alergi, dermatitis atopik dan urtikaria serta shok anafilaksis (Katzung, 2004; Subowo, 2010).



Gambar 2.4. Proses Degranulasi Sel Mastosit yang Menimbulkan Reaksi Hipersensitivitas tipe I (Roitt, 1990).

Aktivitas sel mastosit tidak saja melalui mekanisme keterlibatan IgE atau reseptornya, melainkan terdapat mekanisme lain yang telah dikenal. Misalnya anafilatoksin C3a dan C5a (hasil aktivasi komplemen) dan berbagai obat-obatan seperti kodein, morfin dan bahan kontras dalam radiodiagnostik dapat menyebabkan reaksi anafilaksis. Demikian juga faktor fisik, seperti suhu panas, suhu dingin atau tekanan dapat mengaktifkan sel mastosit, seperti dijumpai pada kasus timbulnya urtikaria yang terinduksi oleh suhu dingin pada kulit (Subowo, 2010).



Gambar 2.5. Skema Pelepasan dan Penghambatan Mediator Dalam Sel Mastosit dan Sel Basofil (Virella, 2007).

Picuan sel mastosit melalui mekanisme hubung silang antar reseptor, mengawali rangkaian peristiwa cepat. Diantara peristiwa cepat yang dikenal adalah melalui perubahan fluiditas membran sebagai akibat dari metilasi forfolipid yang diikuti oleh masuknya ion Ca^{++} dalam sel. Kandungan cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) dan cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*) penting dalam regulasi peristiwa tersebut. Pada umumnya peningkatan kadar cAMP dalam sitoplasma sel mast akan memperlambat dan bahkan menghentikan proses degranulasi. Aktivitas enzim adenilat siklase yang mengubah ATP

menjadi cAMP merupakan mekanisme penting dalam pengaturan peristiwa reaksi hipersensitivitas tipe I (Subowo, 2010). cAMP dan cGMP dapat dihidrolisa oleh enzim Fosfodiesterase menjadi 5 AMP dan 5 GMP. Keseimbangan kedua siklik ini juga dipengaruhi oleh perangsangan saraf simpatis. Bila perangsangan melalui reseptor β adrenergik akan meningkatkan konsentrasi cAMP yaitu melalui pengaktifan enzim adenilat siklase sehingga ATP dapat diubah menjadi cAMP (Gambar 2.6.) (Virella, 2007; Subowo, 2010).

3.3.1. Reaksi Hipersensitivitas Tipe II (Reaksi Sitotoksik)

Reaksi tipe II biasa disebut reaksi sitotoksik. Reaksi ini terjadi karena dibentuknya antibodi jenis IgG atau IgM terhadap antigen yang merupakan bagian sel penjamu. Antigen timbul karena perubahan struktur molekul pada permukaan sel-sel atau adanya konfigurasi baru yang asing yang menempel pada sel-sel tersebut, misalnya obat-obatan (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009).

Mekanisme kerusakan yang bekerja pada reaksi hipersensitivitas tipe II ada 2 macam, yaitu (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009):

1. Terjadi reaksi antigen-antibodi yang menyebabkan aktivitas sistem komplemen dengan segala akibatnya terutama karena adanya lisis sel. Sasaran pada reaksi sitotoksik ini dapat berupa sel darah atau sel dalam jaringan.
2. Dengan bereaksinya antibodi dengan antigen jaringan/sel maka antibodi tersebut melalui bagian Fc atau melalui pengikatan dengan C3b akan menempel pada permukaan fagosit yang memiliki reseptor untuk Fc atau C3b. Penempelan ini akan berlanjut dengan fagositosis sel bersangkutan atau

lisis oleh enzim yang dilepaskan fagosit (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009).

2.4.3. Reaksi Hipersensitivitas Tipe III (Reaksi Komplek Antigen Antibodi)

Hipersensitivitas dimulai dengan adanya reaksi antibodi dan antigen pasangannya membentuk kompleks imun. Apabila kompleks imun ini mengendap pada jaringan, terjadilah beberapa peristiwa yang menyebabkan kerusakannya. Kerusakan jaringan diawali oleh fagositosis kompleks imun atau aktivasi komplemen oleh kompleks imun tersebut. Pada umumnya patogenesis kerusakan jaringan oleh kompleks imun tersebut berlangsung melalui 4 tahap yaitu (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009):

1. Terjadi reaksi antigen-antibodi membentuk kompleks imun.
2. Dalam kondisi tertentu kompleks imun akan mengendap pada jaringan tertentu seperti kulit, ginjal dan sendi.
3. Faktor humoral seperti komplemen atau enzim fagosit dan faktor seluler akan berada di daerah pengendapan.
4. Kerusakan jaringan oleh faktor humoral seluler.

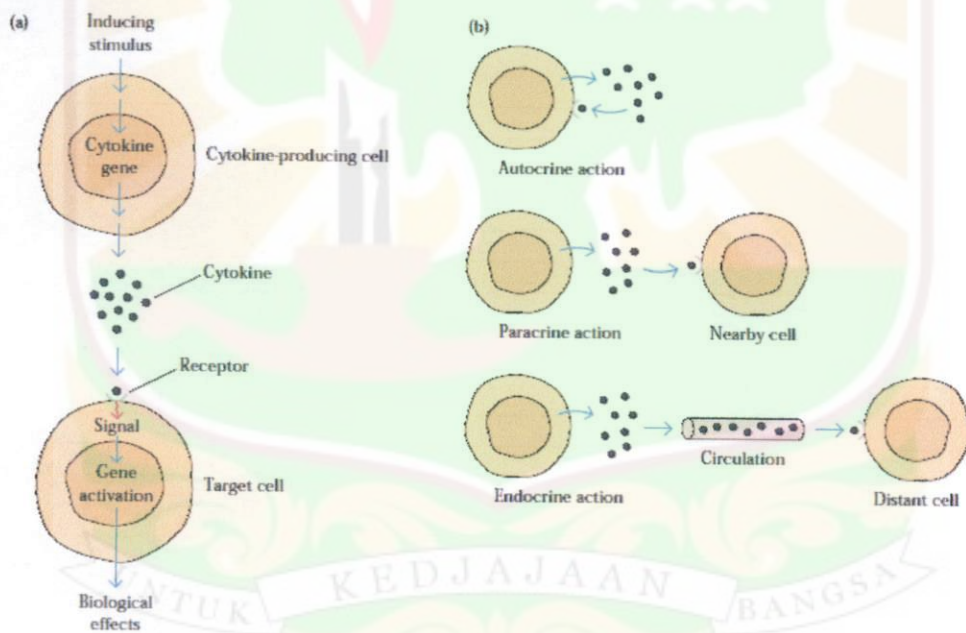
2.4.4. Reaksi Hipersensitivitas Tipe IV (Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat)

Reaksi ini terjadi tidak melibatkan antibodi tetapi melibatkan sel-sel limfosit T. Merupakan reaksi tuberkulin yang timbul lebih dari 24 jam setelah tubuh terpapar dengan antigen tertentu. Reaksi ini diawali dengan sensitisasi oleh antigen yang direspon oleh sel T dengan melepaskan limfokin antara lain *Macrophage Inhibitor Factor* (MIF) dan *Macrophage Activation Factor* (MAF).

Makrofag yang diaktifkan dapat menimbulkan kerusakan jaringan (Abbas, et al., 2004; Baratawidjaja, 2009).

2.5. Sitokin

Sitokin adalah molekul solubel yang berperan sebagai mediator sel-sel pada sistem imun untuk berkomunikasi satu sama lain selama respon imun. Sitokin berperan dalam banyak respon imun seperti aktivitas sel T, sel B, monosit dan makrofag, induksi sitotoksitas dan inflamasi serta beberapa dari sitokin mempunyai efek antineoplastik dan efek terhadap hematopoiesis.



Gambar 2.6. Proses Penginduksian dari Sitokin (a) dan Sifat Kerjanya (b) (Kindt, et al., 2007)

Pada penyakit yang melibatkan reaksi hipersensitivitas tipe I, peranan sitokin sangat besar terutama pada proses pembentukan IgE. Interleukin yang

berperan dalam pengaturan tersebut adalah sitokin yang dihasilkan oleh sel Th2 berupa IL4 dan IL10. IL4 berfungsi sebagai *Growth Factor* untuk sel B yang diaktifkan, meningkatkan ekspresi HLA-DR pada sel B, *Growth Factor* untuk sel T, meningkatkan aktivitas sitolitik dan sel Tc, *Mastcell Growth Factor*, bekerja sinergis dengan CSF dalam merangsang hematopoiesis (Roitt, 1990; Subowo, 2010; Katzung, 2004).

Sitokin memiliki berat molekul yang kecil, merupakan protein atau glikoprotein yang dihasilkan oleh sel leukosit atau sel lainnya dalam tubuh untuk merespon sejumlah stimulant. Sitokin yang dihasilkan dapat mempengaruhi fungsi dari sel dengan cara berikatan dengan reseptor pada permukaan membran sel. Bila sitokin berikatan dengan reseptor pada membran sel penghasilnya maka sitokin tersebut melakukan aktifitas autokrin. Sitokin yang berikatan dengan reseptor pada sel target yang berdekatan dengan sel yang menghasilkannya, disebut aktifitas parakrin sedangkan sitokin berikatan dengan reseptor sel target pada jaringan yang berbeda disebut dengan aktifitas endokrin (Gambar 2.7) (Rautava, et al., 1988; Burtis, et al., 2006; Kindt, et al., 2007).

Sitokin memiliki efek yang beragam dan tergantung pada tipe sel yang direspon pada jaringan dan sistem pengujian yang digunakan. Sitokin yang sama dapat saja dihasilkan oleh sel yang berbeda dan dapat memberikan aktivitas biologis sama atau berlawanan pada sel yang berbeda dan ini merupakan sifat alami dari sitokin. Sitokin disekresikan pada waktu yang singkat dan membatasi diri. Sitokin tidak pernah disimpan sebagai molekul yang *preformed* dan sintesa biasanya diawali dengan transkripsi gen akibat stimulasi. Aktivitas transkripsi

berlangsung sesaat dan mRNA yang menyandi sebagian besar sitokin bersifat tidak stabil, sehingga sintesanya juga sesaat. Sitokin juga mempengaruhi sintesa dan aktivitas sitokin lain dan memungkinkan terjadinya reaksi kaskade dimana sitokin kedua dan ketiga dapat mempengaruhi sitokin pertama. Efek yang timbul dapat bersifat antagonis antara satu dengan yang lainnya atau menghasilkan efek yang lebih besar dari yang diharapkan (Abbas, et al., 2009; Burtis, et al., 2006).

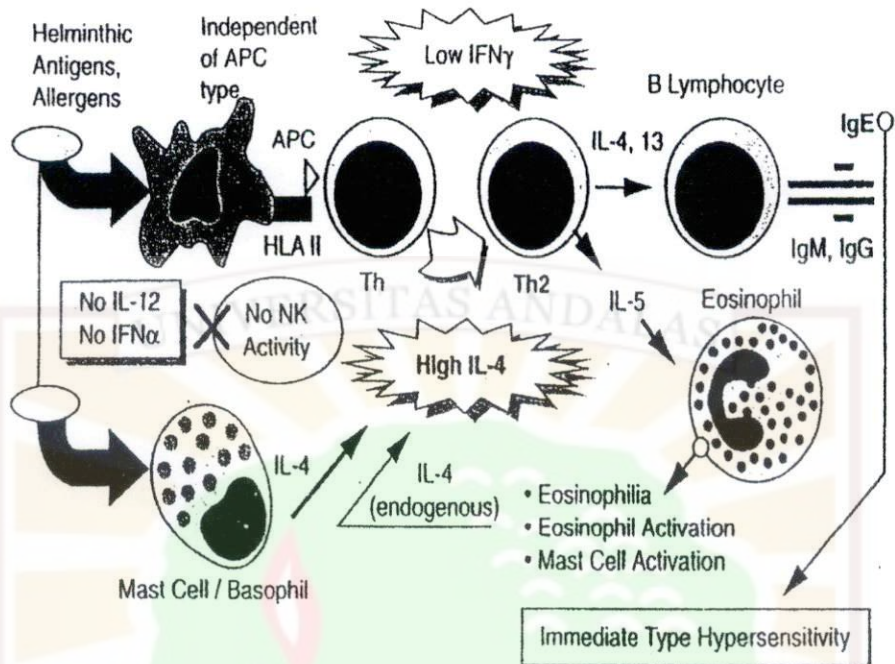
Sistem imunoinflamasi adalah suatu jaringan yang kompleks dari sel dan humoral yang mengandung sitokin. Respon imunoinflamasi dipicu oleh antigen. Antigen dipresentasikan oleh sel khusus yaitu antigen presenting cell (APCs) melalui MHC kelas I atau II. Pada MHC kelas I molekul antigen akan dipresentasikan ke limfosit T CD 8. Pada MHC kls II molekul antigen dipresentasikan ke limfosit T CD 4 (Abbas, et al., 2009; Burtis, et al., 2006).

Reaksi hipersensitif tipe I diawali dengan kontak alergen dengan sel makrofag. Sel makrofag akan memfagositosis alergen tersebut dan dipecah menjadi beberapa fragmen peptida. Fragmen peptida ini akan diikat oleh molekul MHC kelas II dan selanjutnya dipresentasikan ke sel Tho. Disamping itu sel makrofag melepaskan sitokin berupa IL-1 dan $TNF\alpha$. Sel Tho akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Proses diferensiasi sel Th kearah Th1 atau Th2 sangat tergantung pada sitokin di dalam lingkungan mikro dimana sel tersebut distimulasi. Bila pada lingkungan tersebut kaya akan $IFN\gamma$ dan IL-12, maka proliferasi sel Th akan menjadi sel Th1, dan lingkungan yang kaya akan IL-4 akan berpolarisasi menjadi Th2. Secara tipikal, proliferasi dan diferensiasi mejadi Th1 juga distimulasi oleh antigen yang berasal virus atau bakteri

intraselular diikuti oleh presentasi antigen dari sel khusus seperti sel dendrit, dengan menghasilkan IFN γ dan IL-12 yang tinggi. Aktivasi sel NK selanjutnya menyebabkan konsentrasi IFN γ yang tinggi tanpa meningkatkan jumlah IL-4. Lingkungan yang kaya IFN γ dan miskin IL-4 akan meningkatkan proliferasi sel Th menjadi Th1. Th1 yang terinduksi akan melepaskan sitokin IFN γ , dan IL-12. Pada peristiwa reaksi hipersensitif tipe I alergen juga ditangkap oleh sel mastosit dan sel basofil dan selanjutnya sel ini akan melepaskan sitokin IL-4. IL-4 yang tinggi ini akan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel Th2. Sel Th 2 menghasilkan IL-2, IL4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13 sehingga IL-4 semakin tinggi kadarnya. IL-4 mempunyai reseptor pada permukaan sel limfosit B dan sel ini akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma, aktivitas akan semakin meningkat dengan adanya IL-10 dan menghambat proliferasi dan diferensiasi sel Tho menjadi sel Th1. IL-5 yang dihasilkan oleh sel Th2 mempunyai reseptor pada sel eosinofil, sehingga sel tersebut akan meningkat pertumbuhan dan fungsinya serta melepaskan juga IL-4. (Gambar 2.8.) (Abbas, et al., 2009; Burtis, et al., 2006; Kang, et al., 1999).

2.5.1 Interleukin 4 (IL-4)

Interleukin ini dihasilkan oleh sel T, mastosit, sel basofil dan sel eosinofil dengan fungsi utama memicu proliferasi limfosit B, sehingga pada awalnya sitokin ini disebut dengan *B cell stimulating factor* (BSF). Disamping kemampuannya merangsang proliferasi limfosit B yang teraktivasi, IL-4 juga mampu menginduksi ekspresi MHC kelas II pada permukaan limfosit B



Gambar 2.7. Peranan IL-4 Dalam Memproduksi Antibodi IgE (Burtis, et al., 2006).

yang istirahat dan mendorong produksi antibodi khususnya IgE dan IgG₁ dari limfosit B. Sumber utama dari IL-4 adalah sel T CD4⁺, khususnya sel Th2, sel mastosit dan sel basofil. Saat ini diketahui bahwa IL-4 mempunyai fungsi utama dalam meregulator respon imun yang diperantarai oleh IgE dan sel mastosit atau eosinofil. Aktivitas IL-4 tidak terbatas pada sel B, tapi juga pada sel T, makrofag, granulosit, mastosit, prekursor eritrosit dan megakariosit. IL-1 diketahui dapat merangsang sekresi IL-4 oleh sel stroma yang pada gilirannya bersama eritropoetin meningkatkan pertumbuhan koloni eritroid dan bersama G-CSF meningkatkan pertumbuhan koloni granulosit. IL-4 terhadap sel Th2 bertindak

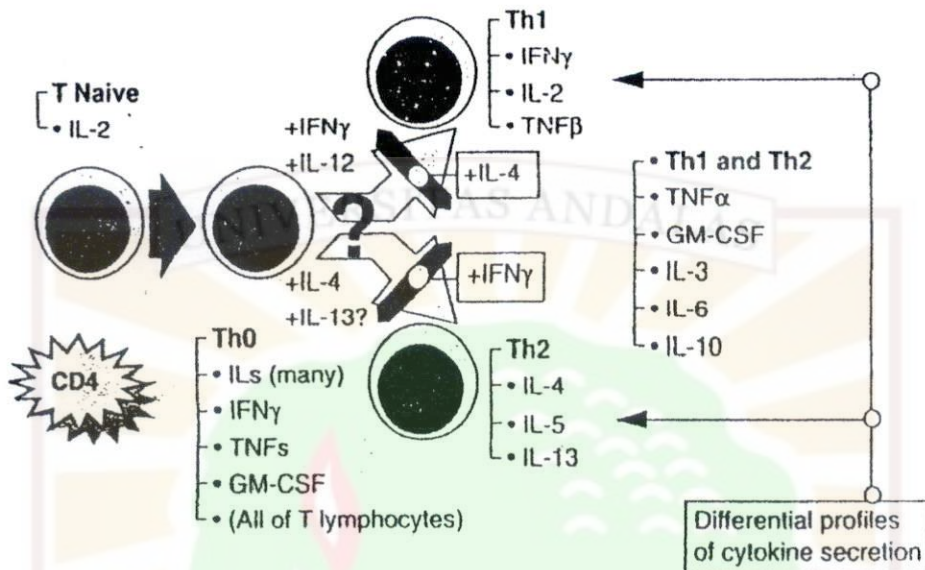
sebagai stimulator, menghambat aktivitas makrofag dan efek ini dapat dilawan oleh $\text{INF}\gamma$ dan IL-10 (Kresno,2003; Burtis, et al., 2006).

2.2.2 Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 adalah sitokin yang dihasilkan oleh sel Th2, sel TCD8, limfosit B dan makrofag. IL-10 mempunyai kemampuan menghambat inflamasi yang kuat, menghambat proses pengenalan antigen oleh sel makrofag dan sel denrit dengan penekanan ekspresi dari MHC kelas II dan menghambat produksi sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 (Parslow, et al., 2001; Burtis, et al., 2006).

Penelitian pada mencit membuktikan bahwa dua subpopulasi limfosit T, yaitu sel Th1 dan sel Th2 dapat dibedakan satu dengan yang lainnya berdasarkan sitokin yang dihasilkannya berbeda. Setelah diaktivasi sel Th1 menghasilkan IL-2 dan $\text{INF}\gamma$, sedangkan Th2 memproduksi IL-4 dan IL-5. $\text{INF}\gamma$ terbukti menghambat respon sel Th2 dan kemudian ditemukan suatu produk sel Th2 yang memiliki kemampuan untuk menghambat produk sitokin oleh sel Th1. Substansi inilah yang disebut dengan IL-10. Dua fungsi utama dari IL-10 adalah menghambat produksi beberapa jenis sitokin (TNF, IL-1, chemokin dan IL-12) dan menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul MHC kelas II pada makrofag, dan mengurangi ekspresi ko-stimulator. Dampak akhir dari aktivitas IL-10 adalah menghambat reaksi inflamasi non spesifik maupun yang spesifik yang diperantarai oleh sel T, sehingga IL-10 disebut juga dengan

cytokine synthesis inhibitor factor dan sitokin anti-inflamasi (Guitz, 2005; Burtis, et.al., 2006).



Gambar 2.8. Peranan Sitokin Dalam Perkembangan Sel T (Burtis, et al., 2006).

Dengan ditekannya sintesa IL-10 maka sel Th1 akan meningkatkan produksi IFN γ dan selanjutnya terjadi keseimbangan antara proliferasi dan diferensiasi sel Th1 dan sel Th2, sehingga jumlah IL-4 menjadi turun (Gambar 2.9). Disamping itu IFN γ dapat menghambat pengikatan IL-4 pada reseptornya di sel plasma sehingga produk IgE dapat dihambat (Burtis, et al., 2006).

2.6. Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

2.6.1 Habitat dan Penyebaran

Mengkudu adalah suatu tumbuhan yang mudah ditemukan di banyak tempat dan dapat tumbuh di tanah kurang subur, asam, atau basa, di daerah

kering maupun basah, umumnya tumbuh di dataran rendah hingga garis pantai. Mengkudu tumbuh pada ketinggian 0-1500 m di atas permukaan laut, bahkan bisa tumbuh di tanah yang lebih tinggi pada daerah khatulistiwa (Steenis, 1988; Handerson and Handcock, 1989).

Mengkudu berasal dari Asia Tenggara (Indonesia) dan kemudian didistribusikan oleh manusia atau dengan cara lain ke kepulauan Pasifik Barat. Biji mengkudu bisa terdistribusi dengan cara mengapung di laut atau dibawa oleh burung atau hewan lain. Mengkudu terdistribusi di daerah tropis, meliputi Indonesia, Indo-Pacific termasuk Polinesia Timur (seperti Hawaii, Kepulauan Line, Marquesas, Kepulauan Society, Austral, Tuamotus, Pitcairn, dan Kepulauan Cook), Melanesia (seperti Fiji, Vanuatu, New Guinea, New Caledonia, dan Kepulauan Solomon), Polinesia Barat (seperti Samoa, Tonga, Niue, 'Uvea/Futuna, Rotuma, dan Tuvalu) dan Mikronesia (seperti Pohnpei, Guam, Chuuk, Palau, Kepulauan Marshall, dan Marianas Utara), Australia, dan Asia Tenggara. Mengkudu juga tumbuh di pantai Amerika Tengah dan Selatan (dari Meksiko, hingga Panama, Venezuela, dan Suriname) dan di berbagai pulau West Indies, Bahama, Bermuda, Florida Keys, dan sebagian Afrika (Steenis, 1988; Handerson and Handcock, 1989; McClatchey, 2002).

2.6.2 Nama Daerah

Di beberapa daerah di Indonesia mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dikenal dengan nama makudu (Lampung), mengkudu (Sumbar), keumudu (Aceh), bakudu (Batak), cengkudu, pace (Jawa), wangkudu (Bali), mangkudu

(Kalimantan), noni (Sulawesi), bakulu, tibah (Nusa Tenggara) (Beacker and Bakhuizen, 1968). Sedangkan diluar Indonesia mengkudu ini dinamakan indian mulberry (India), noni (Hawaii), nono (Tahiti dan Raratonga), polynesian bush fruit, painkiller tree (Caribbean islands), lada (Guam), mengkudo (Malaysia), nhau (Sout heast Asia), grand morinda (Vietnam), cheese fruit (Australia), kura (Fiji), bumbo (Afrika) (Beacker and Bakhuizen, 1968; Heyne, 1987; Steenis, 1988).

2.6.3 Klasifikasi

Tumbuhan mengkudu diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi : Spermatophytae

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Rubiales

Famili : Rubiaceae

Genus : Morinda

Spesies : *Morinda citrifolia* L. (Beacker and Bakhuizen 1968; Heyne, 1987; Corner and Watanabe, 1969)

2.6.4 Morfologi

Tumbuhan berbentuk pohon, tinggi 3–8 m dengan diameter batang 10–15 cm. Daun lebar berbentuk bulat telur atau lonjong, pangkal dan ujung daun runcing dan tepi daun rata. Daun berwarna hijau sampai hijau tua kekuningan,

mengkilat dalam keadaan segar dan menjadi kuning coklat bila kering, panjang daun 19–30 cm dan lebar 6–7 cm.



Gambar 2.9. Tumbuhan Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) (Corner and Watanabe, 1969)

Bunganya putih dan harum, kecil bundar dan tidak teratur dengan panjang 0,5–2,5 cm, tangkai sari panjang 3–3,5 cm dan benang sari panjang 1,5 cm. Kelopak bunga tumbuh menjadi buah bulat lonjong tidak teratur dengan panjang 3–10 cm. Permukaan buah seperti terbagi dalam sel-sel poligonal (segi banyak) yang berbintik-bintik dan berkulit. Mula-mula buah berwarna hijau, menjelang masak menjadi putih kekuningan. Setelah matang, warnanya putih

transparan dan lunak. Daging buah tersusun dari buah-buah batu berbentuk piramida, berwarna coklat merah. Setelah lunak, daging buah mengkudu banyak mengandung air yang aromanya seperti keju busuk. Bau itu timbul karena pencampuran antara asam kaprik dan asam kaproat (senyawa lipid atau lemak yang gugusan molekulnya mudah menguap seperti minyak atsiri) yang berbau tengik dan asam kaprilat yang rasanya tidak enak (McClatchey,2002; Beacker and Bakhuizen,1968; Steenis, 1988; Heyne, 1987; Corner and Watanabe, 1969).

2. 6.5 Khasiat

Mengkudu telah lama digunakan sebagai tanaman obat secara tradisional. Semua bagian tanaman ini digunakan termasuk daun, buah, akar, maupun batang. Berbagai cara penggunaan telah dilaporkan untuk mengobati tekanan darah tinggi, bisul, inflamasi karena berbagai sebab (radang ginjal, radang empedu, radang usus), infeksi jamur, konstipasi, beri-beri, melancarkan kencing, disentri, sembelit, nyeri limpa, limpa bengkak, sakit lever, liur berdarah, kencing manis (diabetes melitus), cacangan, cacar air, kegemukan (obesitas), sakit pinggang (lumbago), sakit perut (kolik), dan perut mulas karena masuk angin, kulit kaki terasa kasar (pelembut kulit), menghilangkan ketombe, antiseptik, peluruh haid (emenagog) dan diare (Potterat and Hamburger, 2007). Buah yang masak dibuat menjadi jus dan digunakan untuk mengobati luka, bisul, sakit gigi, terkilir, rematik dan infeksi cacing (Schäfer, 2008).

Peminat terhadap jus buah mengkudu cukup tinggi dan digunakan sebagai obat alternatif. Tanaman ini merupakan sumber obat yang berpotensi kerana

dipercaya mampu mengobati berbagai macam penyakit dan sekarang dikenal dengan istilah *Hawai Magical Plant* (Handerson, and Handcock, 1989; Wang, et al., 2000; Jayaraman, et al., 2008).

Pengujian untuk mengetahui keamanan mengkudu telah dilaporkan bahwa pada tikus tidak terdapat tanda toksisitas, sedangkan pada babi tidak terdapat reaksi alergi (Winarti, 2005). Nilai LD50 ekstrak alkohol dengan pemberian intraperitoneal 3500 mg/kg bb. dan ekstrak air adalah 7500 mg/kg bb. Nilai ini jauh lebih besar dari batas keamanan suatu obat yaitu besar dari 1000 mg/kg bb (Potterat and Hamburger, 2007). Disamping digunakan sebagai obat alergi, buah mengkudu juga telah digunakan orang sebagai antibakteri, antiviral, antitumor, antihelmentik, analgetik, hipotensi, antiinflamasi dan meningkatkan ketahanan tubuh (Wang, et al., 2002), menghambat pertumbuhan kanker mamae pada mencit yang diinuksi dengan DMBA (Wang, et al., 2003) menekan pertumbuhan sel tumor (Jayaraman, et al., 2008), anti-ulcer (Muralidharan and Srikanth, 2009).

Hasil penelitian telah dilaporkan bahwa ekstrak buah mengkudu mempunyai efek antioksidan dan mencegah terbentuknya superoksida didalam tubuh hewan percobaan (Zin, et al., 2002). Buah mengkudu mengandung senyawa neolignan dan americanin-A yang aktif sebagai antioksidan (Su, et al., 2005). Aktivitas lain dari senyawa ini telah dilaporkan sebagai antitumor pada tikus (Hirazumi and Furusumi, 1999), antikanker pada paru tikus (Wang, et al., 2003) dan hipoglikemia pada tikus (Furusawa, et al., 2003).

Buah mengkudu mengandung polisakarida yang disebut dengan noni. Polisakarida ini mempunyai efek menghambat motilitas gastrointestinal dan menghambat gastritis pada tikus (Fu, et al., 2004). Ekstrak buah mengkudu mempunyai efek hepatoprotektor, yaitu dengan menurunkan enzim AST (aspartat transaminase) dan ALT (alanin transaminase) yang diinduksi dengan parasetamol pada mencit (Sudjarwo, 2004). Endapan polisakarida dapat menstimulasi TNF(tumor nekrosis factor) pada tikus dan IL-1 pada mencit (Hokama, et al., 1993), menghambat factor pertumbuhan tumor paru mencit (Furusawa, et al., 2003). Aktivitas sebagai antitumor, ekstrak buah dapat meningkatkan penghambatan dan penghancuran khusus oleh sel makrofag dan sel NK. Sebagai anti-inflamasi, ekstrak buah mengkudu dapat menghambat COX1 (*cyclooxygenase 1*), COX2 (*cyclooxygenase 2*), IL1 β , IL6, TNF α , dan iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (Hirazumi and Furusawa, 1999; Hornick, et al., 2003).

Penelitian klinis telah dilaporkan bahwa jus buah mengkudu dapat menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida serum pada 106 orang (Skelly, 2006). Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) telah dilaporkan mengandung skopoletin dan antrakuinon, dimana skololetin ini sangat efektif sebagai zat anti radang dan anti alergi (Bangun and Sarwono, 2005). Kandungan skopoletin dari buah mengkudu tidak kurang dari 0,02% dan didalam ekstrak kentalnya terkandung skopoletin tidak kurang dari 0,4% (Anonim,2004; Depkes, 2008). Skopoletin dapat digunakan sebagai senyawa penanda (marker) untuk standarisasi produk dan uji farmakokinetika buah mengkudu (Issell, et al., 2007).

Ekstrak kasar etanol dan fraksi heksan dari buah mengkudu mempunyai aktivitas sebagai antituberkulosa (Saludest et al., 2002). Kandungan utama dari fraksi heksan adalah epitol, sikloartenol, stigmasterol, sitosterol, kampesta-5,7,22-trien-3-ol dan ketosteroid stigmasta-4-en-3-one dan stigmasta-4-22-dien-3-one (Saludes, et al., 2002).

Buah mengkudu sudah dijual dipasar dalam bentuk jus, tablet dan kapsul. Sediaan dalam bentuk jus mempunyai beberapa kelemahan antara lain tidak praktis dan tidak awet. Tablet ekstrak buah mengkudu memiliki waktu hancur yang lama sehingga efektivitasnya kurang terjamin. Bentuk kapsul telah mampu menutupi bau tidak sedap dari buah mengkudu, tetapi terdapat sebagian orang yang mengalami kesulitan untuk menelan kapsul. Oleh karena itu, sangat menarik untuk membuat sediaan dari buah mengkudu yang lebih akseptabel. Tablet *effervescent* merupakan suatu bentuk sediaan yang mampu memberikan rasa enak dalam penggunaan karena gas karbondioksida yang dihasilkan. Bioavailabilitasnya lebih baik dibandingkan tablet biasa, penyiapan larutan dalam waktu seketika dan mengandung dosis yang tepat (Pratiwi, et al., 2011).

Sedian buah mengkudu sudah banyak beredar di Indonesia seperti Pacekap (Puspa Pharma), Honey Mengkudu Juice (Traditional Indonesian Medicine), Blood Care Soft Cap (Kimia Farma) Tahitian Noni Family (Morinda Bioactives), Noni Juice (Trias Sukses Dinamik), Javanoni (Yes Karya Indonesia) dan BSY Noni Black Hair Magic (Magical Magic Comb)

2.6.6. Kandungan Kimia

Buah mengkudu mengandung karbohidrat, protein, vitamin dan mineral-mineral esensial. (Bangun and Sarwono, 2005). Komponen utama mengkudu adalah skopoletin, alkaloid golongan antrakuinon : seperti nordamnaktol, rubiadin dan morindon; karoten, vitamin C, asam linoleat, asam oktanoat, vitamin A, asam caprilat, asam ursolat, dan rutin (Wang, et al., 2002; Djauhariya, 2003). Kadar skopoletin dalam buah mengkudu tidak kurang dari 0,02% dan dalam ekstrak tidak kurang dari 0,4% dengan nilai rendemen ekstrak 10,9% dari serbuk kering buahnya (Anonim, 2004; Depkes, 2008).

Kandungan lain yang dilaporkan dari buah mengkudu ini adalah ditemukan senyawa yang menguap; asam heksanoat, 3-metil-3-buten-1-ol (Farine, et al., 1997), Dari buah mengkudu yang ditanam di Hawaii terdapat 2,6-di-0-(β -D-glukopiranosil)-1-O-oktanoil- β -D-glukopiranosida, rutin, asam asperulosidat (Wang, et al., 1999), 6-0-(β -D-glukopiranosil)-1-O-oktanoil- β -D-glukopiranosida, 6-0-(β -D-glukopiranosil)-1-O-heksanoil- β -D-glukopiranosida, 3-metilbut-3-enil-6-0- β -D-glukopiranosil- β -D-glukopiranosida (Wang, et al., 2000). 3,3-bis-demetilpinoresinol, amerikanol A, amerikanin A, asam amerikanoat, morindolin, isoprinsepin, 5,1,5-dimetilmorindol, alizarin-1-metileter, antragalol-1,3-dimetileter, antragalol-2-metileter, 6-hidroksi-antragalol-1,3-dimetileter), morindon-5-metileter, morindasin, asam deasetilasperulosid (Kamiya, et al., 2004) dan 1-O-(3'-metilbut-3'-enil)- β -D-glukopiranosida, 1-n-butil-4-(5'-formil-2'-furanil)metil sukinat, 4-*epi*-boreriagenin (Samoylenko, et al., 2006). Pada buah mengkudu juga terdapat 6 α -hidroksiadoksosida, 6 β ,7 β -epoksi-8-*epi*-splendosida,

narkisosida (Su, et al., 2005), 2-Metoksi-1,3,6-trihidroksiantrakuinon, 1,8-dihidroksi-2-hidroksimetil-5-metoksiantrakuinon, 1,3-dihidroksi-2-metoksi antrakuinon, 1,6-dihidroksi-5-metoksi-2-metilantraquinon, 2-hidroksi-1-metoksi antrakuinon (Pawlus, et al., 2005),

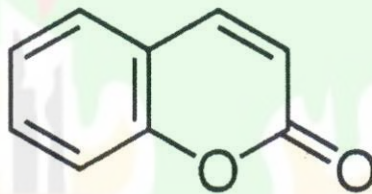
Dari serbuk kering buah noni yang didapat di pasar Amerika terdapat senyawa; noniosid A-H (Dalsgaard, et al., 2006), dari akar yang dikeringkan dengan "freeze dryer" terdapat senyawa; 3,4,3',4'-tetrahidroksi-9,7' α -epoksilignano-7 α ,9'-laktone, 3,3'-bisdemetiltanegool, pinoresinol, 3,3;-bisdemetilpinoresinol, quersetin, kaemferol (Deng, et al., 2007), dari buah yang ditanam di Okinawa Jepang terdapat senyawa; 1,5,15-trimetilmorindol, 2-O-(β -D-glukopiranosil)-1-O-heksanoil- β -D-glukopiranosida, 2-O-(β -D-glukopiranosil)-1-O-oktanoil- β -D-gluko- piranosida (Akihisa, et al., 2007),

2.7. Golongan Kumarin

Senyawa kumarin pertama kali diisolasi pada tahun 1820 oleh Vogel di Munich. Ia berasumsi bahwa aroma yang menyenangkan dari kacang tongka dari Guina dan tanaman *Melifolia officinalis* adalah senyawa kumarin. Nama kumarin berasal dari bahasa Karibia yaitu kata *coumarou* yang diambil dari nama tanaman tonka dengan nama botaninya . *Coumarouna odorata* Aubl. Sekarang nama kumarin sudah diterima sebagai nama trivial untuk senyawa yang strukturnya seperti Gambar 2.9. Pada tahun 1668, kumarin telah diketahui memiliki rumus molekul $C_9H_6O_2$ (Murray, et al., 1988).

2.7.1. Struktur dan Biogenesis Golongan Kumarin

Golongan kumarin adalah salah satu senyawa metabolik sekunder yang memiliki kerangka dasar α -benzo pyron. Golongan kumarin merupakan senyawa fenol yang pada umumnya berasal dari tumbuhan tingkat tinggi dan jarang sekali ditemukan pada mikroorganisme. Dari segi biogenetik, kerangka benzopiran-2-on dari senyawa kumarin berasal asam sinamat yang mengalami proses hidrosilasi, isomerisasi trans-cis pada rantai samping ikatan rangkapnya dan selanjutnya terjadi pembentukan lakton sehingga terbentuk golongan kumarin dan senyawa skopoletin, seperti pada Gambar 2.9 (Murray, et al., 1982).



Gambar 2.9. Struktur Kimia Golongan Kumarin (O'Nail, 2006)

2.7.2 Sinonim Kumarin

Golongan kumarin memiliki sinonim yaitu 2-hidroksi-1-benzopiran-2-on; 1,2-benzopiron; asam *cis*-o-kumarik lakton; kumarin; anhidrat kumarin; tonka bean kamfor (O'Nail, 2006).

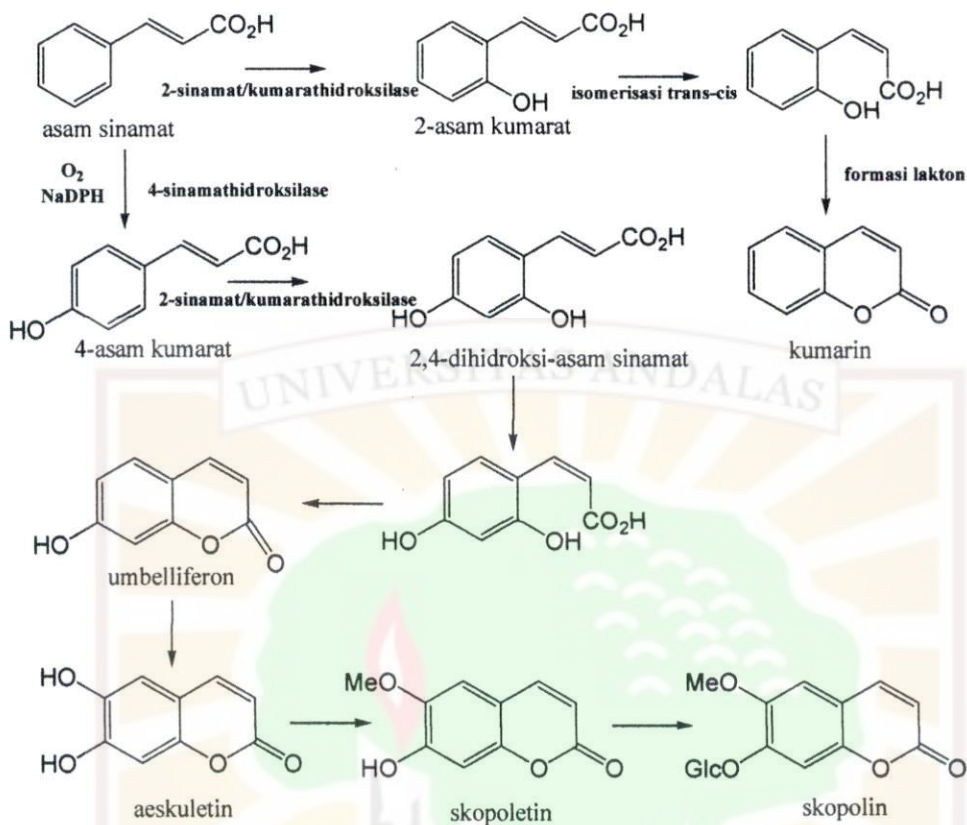
2.7.3. Sifat Kumarin

Golongan kumarin mempunyai bentuk kristal ortohombik, berbau harum menyerupai biji vanilla, rasa pedas, memiliki titik leleh 68-70°C, titik didih 297-299°C. Satu gram kumarin larut dalam 400 mL air dingin dan 50 mL air mendidih. Kumarin mudah larut dalam alkohol, kloroform, eter, serta dalam alkali hidroksida (O'Neil, 2006).

2.7.4 Aktivitas Biologis Golongan Kumarin

Senyawa golongan kumarin dan turunannya banyak memiliki aktivitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, antikoagulan darah, antimikroba dan menunjukkan aktivitas antikarsinogen seperti benzopirol (Alegantina and Isnawati, 2010; Kostova, 2005; Lacy and Kennedy, 2004).

Senyawa kumarin hasil sintesa maupun senyawa turunan kumarin sering digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan, kosmetik, industri obat, serta sebagai insektisida. Kumarin juga digunakan sebagai bahan dasar pembuatan parfum dan sebagai bahan fluoresensi pada industri tekstil dan kertas (Copryadi et al., 2005).



Gambar 2.10. Bagan Biogenesis Golongan Kumarin (Murray, et al., 1988).

2.7.5. Tumbuhan Penghasil Golongan Kumarin

Kumarin adalah suatu golongan metabolik sekunder pada umumnya banyak terkandung pada tumbuhan tingkat tinggi dan jarang sekali ditemukan pada mikroorganisme. Kumarin ditemukan hampir disetiap bagian tumbuhan mulai dari akar, batang, daun sampai bunga dan juga buah. Kumarin banyak terdapat dalam bentuk glikosida dimana bau yang didapat dari pengeringan seperti bau jerami yang mencirikan terjadinya hidrolisis glikosida senyawa tersebut. Kumarin dapat dianggap suatu lakton dari suatu senyawa fenolik yaitu ortokumarin (asam orto hidroksi sinamat), apabila gugus fenolnya

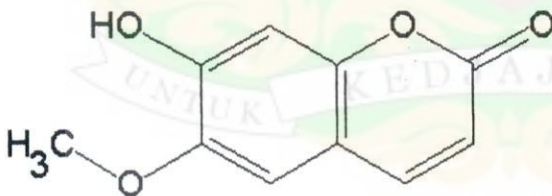
terikat dengan molekul glukosa maka terbentuk glikosida (Alegantina and Isnawati, 2010; Kostova, 2005).

. Famili tumbuhan yang menghasilkan golongan kumarin pada umumnya adalah famili Rutaceae, Leguminoceae, Umbelliferae dan Graminae. Senyawa kumarin ditemukan hampir di setiap bagian tumbuh-tumbuhan mulai dari akar, batang, daun, hingga bunga dan buah (Copriyadi, et al., 2005).

Senyawa golongan kumarin ditemukan dalam jumlah banyak pada tumbuhan kayu manis (*Cynamomum aromaticum* Nees.), biji tonka (*Dipteryx odorata*), daun vanila (*Vanilla planifolia*), buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), daun lavender (*Lavandula angustifolia* L.), *Garcinia balica* Miq., strawberi, ceri, jeruk purut (*Citrus hystrix* DC), kulit batang murbai (*Morus alba* L.), pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) dan *Protium javanicum* Burm. F. (Adfa, 2006; Copriyadi, et al., 2005; Murray, et al. 1998).

2.8. Skopoletin

2.8.1 Struktur Kimia Skopoletin



Rumus Molekul: $C_{10}H_8O_4$

Berat Molekul :192.17

Gambar 2.11. Struktur Molekul Skopoletin (O'Nail, 2006).

2.8.2 Sinonim Skopoletin

Skopoletin merupakan salah satu zat aktif yang dikandung oleh buah mengkudu. Skopoletin memiliki sinonim diantaranya yaitu 2H-1-benzopiran-2-one, 7-hidroksi-6-metoksi; 6-metoksi-7-hidroksikumarin, 6-metileskuletin; 6-O-metileskuletin; 7-hidroksi-6-metoksi-2h-1-benzopiran-2-on; 7-hidroksi-6-metoksikumarin; beta-metileskuletin; buksuletin; kumarin-7-hidroksi-6-metoksi; ekopoletin; Skopoletine; Skopoletol; 6-metoksikumarin; 6-meoksiumbeliferon; 7-hidroksi-5-metoksikumarin; 7-hidroksi-6-metoksi-2h-1-benzopiran-2-one; 7-hidroksi-6-metoksi-2h-kromen-2-on; 7-hidroksi-6-metoksikumarin; asam krisaptropik (Murray, et al., 1982; O'Nail, 2001).

2.8.3. Sifat Skopoletin

Skopoletin merupakan senyawa turunan kumarin. Skopoletin memiliki ciri-ciri yaitu berbentuk kristal agak kuning, titik leleh 200-207°C, sukar larut dalam air dan mudah larut dalam asam asetat. Skopoletin akan berfluoresensi biru di bawah sinar UV-Vis_{365nm}. (Murray, et al., 1982; O'Nail, 2001).

2.8.4 Aktivitas Skopoletin

Senyawa-senyawa golongan kumarin biasanya digunakan sebagai anti koagulan, contohnya warfarin, tetapi skopoletin tidak menunjukkan efek seperti itu. Berdasarkan hasil penelitian, skopoletin telah terbukti dapat memperlebar pembuluh darah dan melancarkan peredaran darah, membunuh beberapa bakteri, antiradang, anti-alergi, antikanker (Wang, et al., 2000; Moon, et al., 2007)

Skopoletin dapat menginduksi proliferasi sel limfosit T normal, karena interaksi dengan protein kinase C, sehingga skopoletin dapat digunakan sebagai senyawa antitumor yang potensial untuk menyembuhkan penyakit kanker (Manuelle, 2006). Skopoletin menghambat pelepasan PGE₂, TNF- α , IL-1 β dan IL-6 dan menekan ekspresi COX-2 pada konsentrasi tertentu (Kim, et al., 2004). Aktifitas anti-inflamasi skopoletin menghambat biosintesa eikosanoid, influk sel, dan peroksidasi (Ding, et al., 2009). Skopoletin telah diidentifikasi sebagai senyawa utama anti-inflamasi. Percobaan menggunakan model inflamasi pada telinga tikus menunjukkan skopoletin menghambat produksi myeloperoksidase dan PGE₂ (Haiqing, et al., 2008). Skopoletin menghambat PC₃ proliferasi dengan menginduksi sel PC₃ apoptosis (Liu, et al., 2001).

Skopoletin mempunyai potensi untuk menghambat fungsi tiroid dalam kasus hipertiroid dan mengatasi hiperglisemia dengan pemberian 1 mg/kg (Sunanda and Anand 2006). Penelitian terbaru menguji skopoletin yang diformulasi dalam bentuk enkapsulasi nanopartikel polimerik yang memiliki efek potensi antikanker (Bukhsh, et al., 2010).

2.8.5. Tanaman Penghasil Skopoletin

Senyawa skopoletin tersebar luas diberbagai tumbuhan, seperti *Solanum pinnatisectum* (Harborne, 1959), ranting *Solanum lyratum* (Kang, et al., 1998), *Artemisia feddei* (Kang, et al., 1999), dari batang *Fraxinus rhynchophylla* (Kim, 1999), dari akar *Argyreia speciosa* (Shukla, et al., 1999), pada daun *Hevea brasiliensis* (Silva, et al., 2000), buah *Lycium barbarum* L. (Liu, et al., 2000),

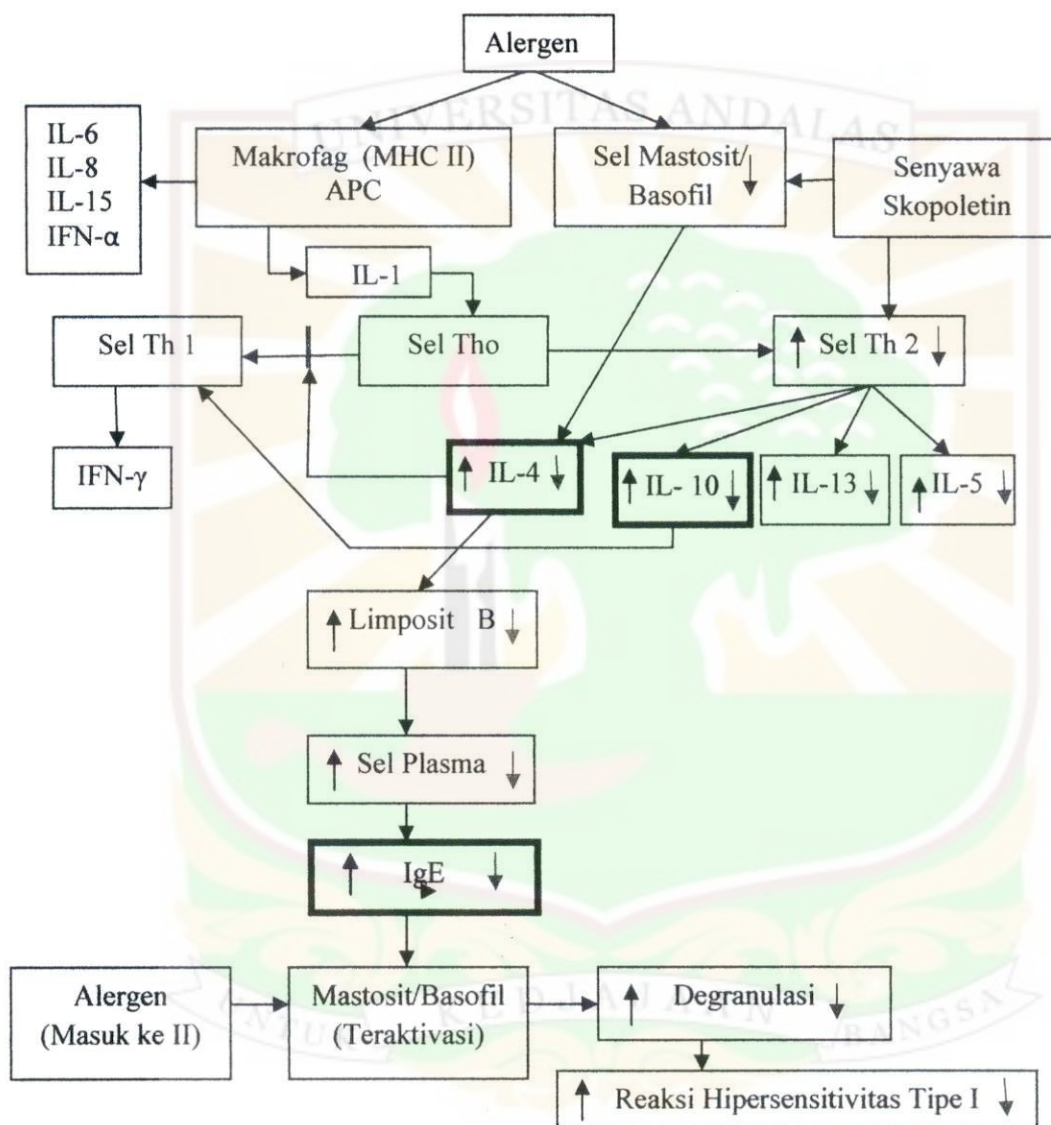
Eupatorium buniifolium (Muschietti, et al., 2001), kulit akar *Hibiscus syriacus* (Yun, et al., 2001), *Sinomonium acutum* (Shaw, et al., 2003), dari daging buah *Melia azedarac* L. (Carpinella, et al, 2005),), *Canscora decussate* Schult. (Sethiya, et al., 2008) dan *Manihot esculenta* Crantz (Bayoumi, et al, 2008) serta pada bunga, buah dan daun *Anethum graveolens* (Ortan, et al., 2009).



BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan :  yang diperiksa.

Penjelasan Kerangka Konseptual

Alergen masuk ke dalam tubuh menimbulkan respon imun yang dimulai dari sel makrofag. Sel makrofag menfagositosis alergen, selanjutnya dipecah menjadi fragmen peptida dan fragmen peptida ini dipresentasikan ke sel Tho (naif) melalui MHC kls II. Sel makrofag juga melepaskan IL-1, IL-6, IL-8, IL-15 dan TNF α . Alergen juga ditangkap oleh sel mastosit dan sel basofil, selanjutnya sel ini akan melepaskan IL-4. Dengan adanya sinyal yang dilepaskan oleh makrofag dan tingginya kadar IL-4 maka proses diferensiasi dan proliferasi sel Tho hanya menuju sel Th2. Sel Th2 menghasilkan IL4, IL-5, IL-10 dan IL-13. IL-4 berikatan dengan reseptornya di sel limfosit B maka sel ini akan berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi sel plasma. Selanjutnya sel plasma akan menghasilkan IgE dan masuk ke dalam sirkulasi, selanjutnya IgE terikat pada permukaan sel mastosit dan sel basofil. IL-4 dan IL-10 dapat menekan proliferasi dan diferensiasi sel Tho menjadi sel Th1 serta menghambat sel Th2 untuk memproduksi sitokin dan aktivits sel plasma semakin meningkat sehingga produk antibodi IgE semakin tinggi.

Alergen yang sama masuk untuk kedua kalinya, akan berikatan dengan antibodi IgE yang ada pada permukaan sel mast dan sel basofil. Ikatan ini akan memicu aktivitas enzimatis pada membran sel dan selanjutnya terjadi proses degranulasi. Proses degranulasi melepaskan beberapa mediator kimia yang tersimpan dalam granul. Mediator utama yang dilepaskan adalah histamin, ECF-A dan NCF-A. Mediator inilah yang bertanggung jawab dalam reaksi hipersensitivitas tipe I.

Senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu bekerja pada sel Th2 dengan menekan produksi IL-4 dan IL-10, serta pada sel mastosit dan sel basofil.

Bila IL-4 dan IL-10 menurun, maka akan terjadi keseimbangan kembali antara proliferasi dan diferensiasi sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 akan menghasilkan INF γ dan sitokin ini akan menghambat produksi IL-4 dan IL-10 oleh sel Th2 serta menghambat pengikatan IL-4 pada reseptornya dipermukaan sel limposit B sehingga produksi IgE dapat ditekan.

3.2. Hipotesis Penelitian

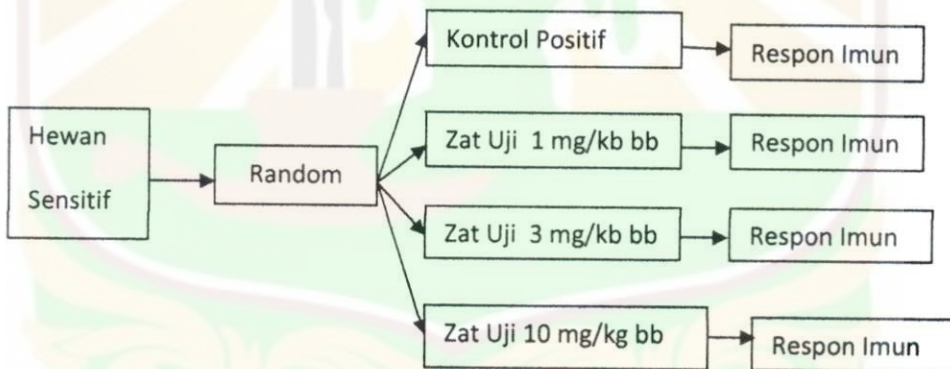
1. Ada pengaruh senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IL-4 pada mencit hipersensitivitas tipe I.
2. Ada pengaruh senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IL-10 pada mencit hipersensitivitas tipe I.
3. Ada pengaruh senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap kadar IgE pada mencit hipersensitivitas tipe I.

BAB IV

METODA PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental murni, yaitu penelitian memberi perlakuan pada mencit (*Mus musculus* galur Swiss Webster) sebagai hewan percobaan. Rancangan penelitian yang dilakukan adalah rancangan acak lengkap satu arah dengan pertimbangan bahwa populasi hewan percobaan homogen. Perbedaan yang timbul antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan semata-mata disebabkan oleh eksperimen yang dilakukan oleh peneliti.



Keterangan :

- Hewan Sensitif : Hewan yang telah disensitisasi dengan ovalbumin. dan telah positif sensitif dengan ovalbumin.
Zat Uji : Senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu.
Respon Imun : Penentuan respon imun berupa kadar IL-4, IL-10 dan IgE.

4.2. Populasi, Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi hewan percobaan yang dipakai adalah mencit putih jantan (*Mus musculus* galur Swiss Webster) dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang.

4.2.2. Sampel

Sampel yang digunakan berasal dari kelompok populasi yang memenuhi kriteria inklusif dan eksklusif. Kriteria inklusif yang harus dipenuhi berupa jenis kelamin jantan, umur 6 minggu dan berat badan 20-25 gram sedangkan kriteria eksklusif dari mencit harus sudah sensitif terhadap ovalbumin.

4.2.2. Besar dan Teknik Pengambilan Sampel

Pemilihan sampel dilakukan cara random dengan metode acak sederhana. Penelitian ini mengukur 3 parameter yaitu IL-4, IL-10 dan IgE. Setiap parameter terdiri dari 5 kelompok, yaitu kelompok hewan normal, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan dosis 1 mg/kg bb, kelompok dosis 3 mg/kg bb. dan kelompok dosis 10 mg/kg bb. Setiap kelompok diamati kadar IL-4, IL-10 dan IgE.

Untuk menentukan besar sampel (n) dari masing masing kelompok menggunakan rumus besar sampel (n) adalah (Hanafiah, 1997):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan : t = Jumlah kelompok hewan coba
r = Jumlah hewan coba masing-masing kelompok

Penelitian ini diketahui jumlah kelompok hewan coba (t) sebanyak 5 kelompok, maka didapat jumlah hewan coba pada masing-masing kelompok (r) adalah sebagai berikut :

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$r \geq 19 : 4$$

$$r \geq 4,75$$

Jadi sampel untuk setiap kelompok adalah 5 ekor. Total sampel yang diperlukan pada penelitian ini berjumlah 25 ekor.

4.3 Klasifikasi Variabel dan Defenisi Operasional Variabel

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Variabel independen : - skopoletin

Variabel dependen : -IL4

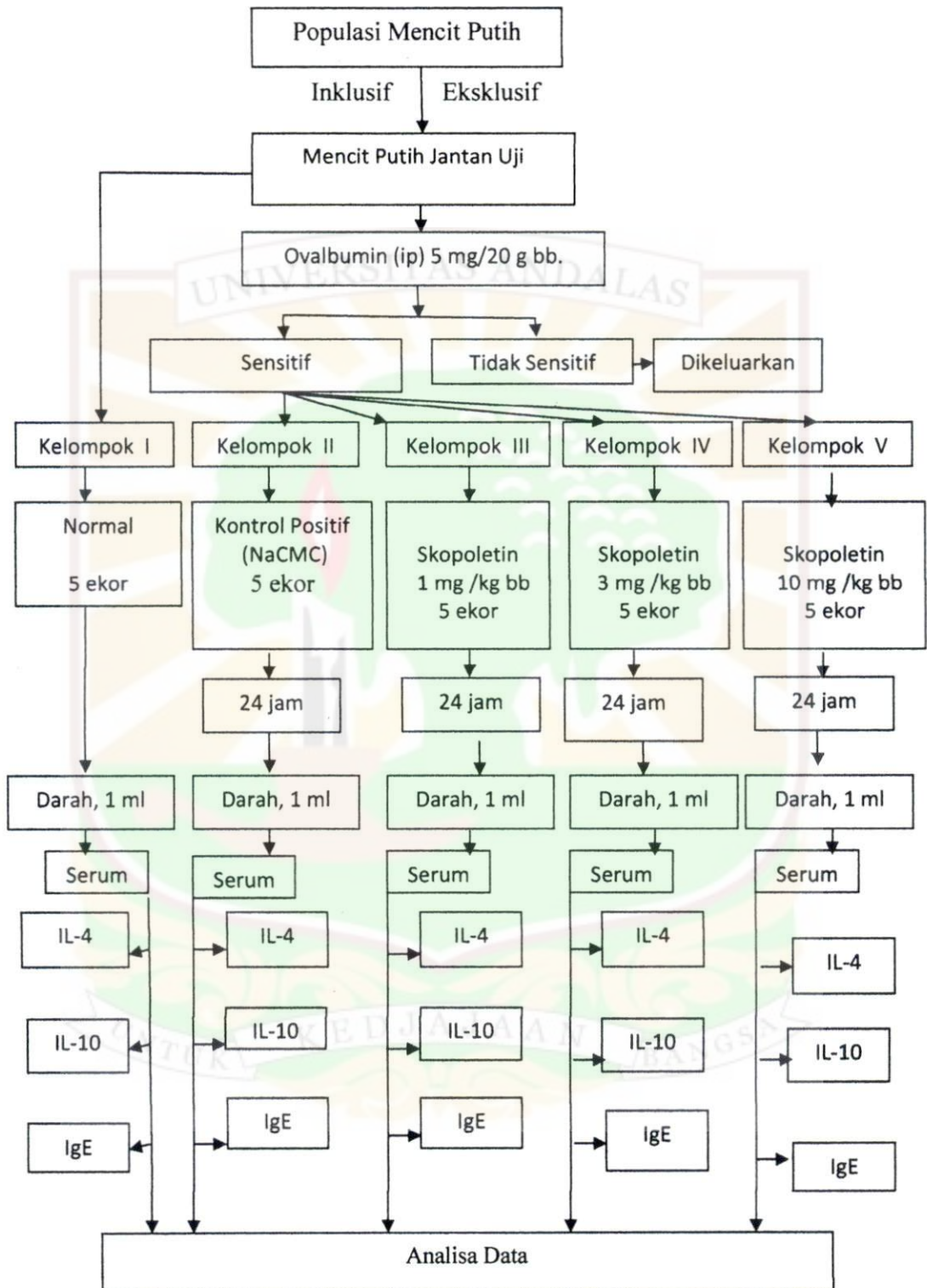
-IL10

- IgE

4.3.2. Defenisi Operasional Variabel

Definisi operasional	Skala ukur	Cara ukur	Hasil ukur
Skopoletin adalah senyawa kimia yang diisolasi dari buah mengkudu.	Rasio	Neraca analitik	mg/kg
IL4 adalah senyawa glikoprotein yang dihasilkan oleh sel sistim imun yang terdapat didalam serum mencit putih jantan sensitif terhadap ovalbumin.	Rasio	<i>ELISA</i>	pikogram/ml
IL10 adalah senyawa glikoprotein yang dihasilkan oleh sel sistim imun yang terdapat didalam serum mencit putih jantan sensitif terhadap ovalbumin.	Rasio	<i>ELISA</i>	pikogram/ml
IgE adalah immunoglobulin yang dihasilkan oleh sel plasma yang terdapat didalam serum mencit sensitif terhadap ovalbumin.	Rasio	<i>ELISA</i>	nanogram/ml

4.4. Kerangka Operasional Penelitian



Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok, yaitu kelompok I sebagai hewan normal terdiri 5 ekor dan kelompok II, III, IV dan V masing masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih yang telah mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I. Mencit yang digunakan berumur 6 minggu dengan berat 20-25 gram. Hewan yang telah mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok II kontrol positif yang diberi larutan NaCMC, kelompok III yang diberi skopoletin dosis 1 mg/kg bb., kelompok IV dosis 3 mg/kg bb. dan kelompok V dosis 10 mg/kg bb. Setelah 24 jam darah mencit diambil sebanyak 1 ml, dibiarkan 30 menit, disentrifugasi selama 10 menit, 2000 rpm dan selanjutnya ditentukan kadar IL-4, IL-10 dan IgE.

4.5. Pemantapan Mutu

Penelitian ini selalu melakukan pemantapan mutu pada semua tahapan guna menjamin ketelitian dan ketepatan hasil pemeriksaan laboratorium. Cakupan objek pemantapan mutu meliputi aktivitas tahap pra-analitik, tahap analitik, dan tahap pasca-analitik. Pemantapan mutu bertujuan untuk memastikan bahwa segala sesuatu sudah dilakukan dengan benar sehingga kevalidan data yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan secara akademis. Sasaran yang menjadi objek kegiatan pemantapan mutu adalah (Yamin, dkk., 1999) :

1. Proses persiapan dan perlakuan terhadap hewan coba. Persiapan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan dengan pengontrolan terhadap suhu dan kelembaban, sehingga dapat dipastikan hewan coba

mendapatkan lingkungan yang menyenangkan. Makanan dan minuman diberikan sesuai kebutuhan. Dengan demikian dapat dipastikan bahwa semua populasi mendapatkan perlakuan yang sama.

2. Proses pengambilan, pengiriman, penyimpanan, dan pengolahan spesimen. Pengambilan spesimen dilakukan oleh tenaga yang sudah terlatih sehingga dampak terjadinya kerusakan spesimen saat pengambilan dapat dihindarkan atau dikurangi. Proses pengiriman, penyimpanan dan pengolahan spesimen akan dilakukan sesuai dengan prosedur standar.
3. Pengujian terhadap kualitas reagen. Reagen yang diterima akan dilakukan pengecekan terhadap keutuhan segel dan wadah, no bath, dan tanggal kadaluarsa.
4. Uji ketelitian dan ketepatan. Khusus untuk setiap alat yang akan digunakan pada pemeriksaan variabel penelitian dilakukan *quality control* sistem dengan menentukan harga *coefficient of variation* (COV). Setelah harga COV diperoleh dari masing-masing senyawa lebih kecil dari 5 % baru dilakukan pemeriksaan terhadap sampel. Tenaga yang melakukan pemeriksaan laboratorium adalah tenaga teknis labor yang sudah terlatih melakukan pemeriksaan, diharapkan untuk satu jenis pemeriksaan dilakukan oleh satu orang tenaga labor.
5. Sistem pencatatan dan pelaporan dilakukan dengan benar dan terdokumentasi. Peralatan laboratorium perlu dilakukan kalibrasi. Semua proses pemantapan mutu (*quality assurance*) pada penelitian ini telah

mengacu kepada protap yang dikeluarkan oleh Pusat Laboratorium Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Kebun Tanaman Obat Universitas Andalas, Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi, Laboratorium Sentral Fakultas Farmasi dan Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang mulai dari bulan Maret sampai dengan bulan November 2011.

Buah mengkudu diambil di Kelurahan Kurao Pagang Kecamatan Nangalo Padang Sumatera Barat.

Pembuatan serbuk kering buah mengkudu dan isolasi senyawa skopoletin di Laboratorium Kebun Tanaman Obat dan karakterisasinya simplisia dan senyawa skopoletin hasil isolasi dilakukan di Laboratorium Tablet dan Laboratorium Sentral Fakultas Farmasi. Persiapan binatang percobaan sampai memenuhi syarat umur dan berat badan yang sudah ditentukan dilakukan di kandang Hewan Fakultas Farmasi dan intervensi penelitian yang dimulai dari sensitisasi mencit sampai pemberian senyawa skopoletin serta pengambilan darah dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang. Sedangkan pemeriksaan kadar IL-4, IL-10 dan IgE dilakukan di Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

4.7. Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian

4.7.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah daging buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang telah dikeringkan dan dihaluskan, diklorometan (DCM), heksan, etil asetat, metanol, air suling, NaCl fisiologis, Na CMC, skopoletin pembanding (Exrtasynthese, Lot 10041510), air suling, HCl (asam klorida) 12 N, ovalbumin (Merk No. Lot.20HO763 A-5253), kit Mouse IL-4 Platinum ELISA (eBioscience, BMS613 No. 887944), kit Mouse IL-10 Platinum ELISA (eBioscience, BMS 614/2, No. 887904) dan kit Mouse IgE ELISA (Immunology Consultants Laboratory, Inc. E-90E, Lot#6),

4.7.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah kertas saring, seperangkat alat soklet, *rotary evaporator*, seperangkat alat kromatografi kolom, vial, bejana (*chamber*) KLT dan plat KLT, desikator, pipet tetes, alat suntik, gelas ukur, timbangan hewan, spatel, jarum oral, timbangan analitik, wadah (botol), lumpang dan stamfer, gunting bedah, lampu UV 365 nm, seperangkat alat sentrifuge, tabung sentrifuge, spektrofotometer UV-Vis 1601 (Pharmaspec 1700), spektrofotometer IR (Perkin Elmer 735) dan spektrofotometer BIO-RAD.

4.8. Prosedur dan Pengambilan Data

4.8.1. Pembuatan Serbuk Kering buah Mengkudu

Buah mengkudu yang sudah matang sebanyak 11,8 kg di potong-potong tipis dengan ketebalan 2-3 mm dan bijinya dibuang, selanjutnya dikeringkan dalam rumah kaca selama 3 hari. Setelah itu pengeringan dilanjutkan di dalam oven pada suhu 50° C selama 3 hari. Potongan tipis dari buah mengkudu yang telah kering diblender. Serbuk kering buah mengkudu diperoleh sebanyak 1,216 kg dan dievaluasi ukuran partikel, susut pengeringan dan kadar abu menurut Farmakope Indonesia Edisi III.

4.8.2. Isolasi dan Karakterisasi Skopoletin dari Buah Mengkudu

Sebanyak 960 g daging buah mengkudu kering dibungkus dengan kertas saring, dibentuk seperti selinder lalu dimasukkan ke dalam tabung soklet dan kedalam labu destilasi ditambahkan pelarut diklorometan sebanyak 3 liter selanjutnya dipanaskan pada suhu rendah (60° C). Pelarut akan turun setelah 90 menit. Proses ekstraksi dilakukan selama 12 jam. Ekstrak yang didapat diuapkan *in vacuo* sampai ekstraknya kental dan selanjutnya dikeringkan. Ekstrak kering disuspensikan dengan silika gel (200 g) pelarut n-heksan:etil asetat (1:4). Suspensi (isokratik) yang didapat dimasukkan ke dalam kolom yang bawahnya telah dilapisi dengan kapas. Kolom dielusi dengan pelarut n-heksan:etil asetat (1:4). Eluat yang keluar ditampung dengan vial dan senyawa skopoletin yang tertarik dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan penampak noda lampu ultra violet (UV) pada panjang gelombang 365 nm. Senyawa skopoletin

terdeteksi pada vial ke 6 sampai dengan vial ke 12. Noda yang diperoleh masih *tailing* dan ini menandakan masih ada senyawa lain. Untuk memurnikan senyawa skopoletin dilakukan kromatografi kolom menggunakan fase diam *sephadex LH20* dan fase gerak metanol. Senyawa skopoletin dilarutkan ke dalam metanol, lalu di lewatkan pada *sephadex LH20* dan ditampung dengan vial. Hasil ekstraksi dimonitor lagi dengan KLT, hasil KLT yang diperoleh dibandingkan dengan senyawa skopoletin pembanding (*Extrasynthese* Perancis). Untuk menentukan tingkat kemurniannya dilakukan dengan menggunakan HPLC.

4.8.3. Pembuatan Suspensi Skopoletin

Larutan uji dibuat suspensi dalam Na CMC 0,5% karena skopoletin sukar larut dalam air. Sebanyak 50 mg Na CMC dikembangkan dengan air panas sebanyak 1 mL. Kemudian skopoletin ditimbang sebanyak 10 mg digerus pada lumpang lain, dan ditambahkan Na CMC yang telah dikembangkan tadi. Setelah itu volumenya dicukupkan sampai 10 ml dengan air suling sehingga diperoleh konsentrasi 0,1%. Selanjutnya larutan skopoletin dibuat pengenceran 0,03% dan 0,01%. Untuk dosis 1 mg/kg bb diberikan larutan skopoletin 0,01% sebanyak 0,2 ml/20 g bb. mencit, dosis 3 mg/kg bb diberikan larutan skopoletin 0,03% sebanyak 0,2 ml/20 g bb mencit dan untuk dosis 10 mg/kg bb adalah diberikan larutan 0,1% sebanyak 0,2 ml/20 g bb. Peningkatan dosis dilakukan sesuai dengan aturan yang dikemukakan oleh Thomson.

4.8.4. Teknik Pembuatan Hewan Sensitif

Mencit sehat dengan berat badan 20-25 g disuntikkan secara intraperitoneal dengan ovalbumin 5 mg/20 g bb. Pada hari ke tiga hewan mencit diberi ovalbumin lagi dengan dosis 5 mg/20 g bb secara subkutan. Hewan dinyatakan hipersensitivitas tipe I jika pada hari ke tujuh setelah penyuntikan ovalbumin pada tempat penyuntikan tersebut timbul warna kemerahan.

4.8.5. Pemberian Sediaan Uji

Mencit dibagi 5 kelompok, yaitu satu untuk kelompok normal (kelompok I) dan empat kelompok hewan yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I. Untuk empat kelompok terdiri dari kelompok II kontrol positif diberi larutan NaCMC, kelompok III diberi senyawa skopoletin dosis 1 mg/kg bb., kelompok IV diberi senyawa skopoletin dosis 3 mg/kg bb dan kelompok V diberi senyawa skopoletin dosis 10 mg/kg bb. Pemberian larutan NaCMC dan senyawa skopoletin langsung diberikan pada saat terlihat tanda kemerahan ditempat suntikan. Pemberian sediaan dilakukan secara peroral (savage) dengan bantuan sonde standar mencit dengan panjang 3 cm dan volume pemberian 0,2 ml/20 g bb mencit.

4.8.6. Pengambilan Serum Uji

Pengambilan serum untuk penentuan kadar IL-4, IL-10 dilakukan setelah 24 jam pemberian sediaan larutan NaCMC dan senyawa skopoletin dengan cara *guillotine*.

4.8.7. Penentuan Jumlah IL-4

Kadar IL-4 ditentukan dengan metoda *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) menggunakan kit Mouse IL-4 Platinum ELISA. *Microwell* disiapkan dan dicuci dua kali dengan larutan buffer pencuci (Wash Buffer). Pipet masing masing larutan standar sebanyak 100 μ L dan masukan ke dalam masing masing sumur *microwell*. Berikutnya dipipet 100 μ L dari larutan sampel dan dimasukan ke dalam sumur yang lainnya. Pada semua sumur ditambahkan larutan biotin-konjugat. *Microwell* ditutup dengan film adhesive dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 jam. Isi *microwell* dibuang dan dicuci dengan larutan pencuci (wash buffer). Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan Streptavidin-HRP di masukan pada masing masing sumur sebanyak 100 μ L, selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Isi cairan *microwell* dibuang lagi dan dicuci dengan larutan juga dilakukan sebanyak 3 kali. Pada masing masing sumur ditambahkan larutan substrat TMB (tetrametil benzidin) sebanyak 100 μ L dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah 10 menit pada masing masing sumur ditambahkan larutan stop (stop solution) sebanyak 100 μ L. Selanjutnya ditentukan nilai absorban dari masing masing larutan dalam sumur *microwell* pada panjang gelombang 450 nm.

4.8.8. Penentuan Jumlah IL-10

Kadar IL-10 ditentukan dengan metoda *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) menggunakan kit Mouse IL-10 Platinum ELISA. *Microwell* disiapkan dan dicuci dua kali dengan larutan buffer pencuci

(Wash Buffer). Pipet masing masing larutan standar sebanyak 100 μL dan dimasukkan ke dalam masing masing sumur *microwell*. Berikutnya dipipet 100 μL dari larutan sampel dan dimasukkan ke dalam sumur yang lainnya. Pada semua sumur ditambahkan larutan biotin-konjugat. *Microwell* ditutup dengan film adhesive dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 jam. Isi *microwell* dibuang dan dicuci dengan larutan pencuci (wash buffer). Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan Stretavidin-HRP dimasukkan pada masing masing sumur sebanyak 100 μL selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Isi cairan *microwell* dibuang lagi dan dicuci dengan larutan juga dilakukan sebanyak 3 kali. Pada masing masing sumur ditambahkan larutan substrat TMB (tetrametil benzidin) sebanyak 100 μL dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah 10 menit pada masing masing sumur ditambahkan larutan stop (stop solution) sebanyak 100 μL . Selanjutnya ditentukan nilai absorban dari masing masing larutan dalam sumur *microwell* pada panjang gelombang 450 nm.

4.8.9. Penentuan Jumlah IgE

Penentuan jumlah antibodi IgE dalam serum ditentukan dengan metode *ELISA* menggunakan Mouse IgE *ELISA* (Immunoperoxidase Assay for Determination of IgE in Mouse Sera). Semua reagen disiapkan pada suhu kamar sebelum digunakan. Pipet masing masing larutan standar sebanyak 100 μL dan dimasukkan ke dalam masing masing sumur *microwell*. Berikutnya dipipet 100 μL dari larutan sampel dan dimasukkan ke dalam sumur yang lainnya. *Microwell*

ditutup dengan film adhesive dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Isi cairan *microwell* dibuang dan dicuci dengan larutan pencuci (wash solution concentrate). Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 4 kali. Larutan antibodi konyugasi enzim (enzyme antibody conjugate) di masukkan pada masing masing sumur sebanyak 100 μ L selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit pada tempat yang gelap. Isi cairan *microwell* dibuang lagi dan dicuci dengan larutan pencuci (wash solution concentrate) juga dilakukan sebanyak 4 kali. Pada masing masing sumur di tambahkan larutan substrat (chromogen substrate solution) sebanyak 100 μ L dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah 10 menit pada masing masing sumur ditambahkan larutan stop (stop solution) sebanyak 100 μ L. Selanjutnya ditentukan nilai absorban dari masing masing larutan dalam sumur *microwell* pada panjang gelombang 450 nm.

4.9. Persyaratan Etik

Periode yang telah dilalui hewan coba dalam penelitian ini meliputi; masa persiapan, pelaksanaan dan pemusnahan. Periode persiapan merupakan masa pemeliharaan yang diperlukan untuk mengkondisikan hewan coba sampai siap untuk diberikan perlakuan. Periode pelaksanaan merupakan masa hewan coba diberikan perlakuan sampai pengambilan spesimen. Periode pemusnahan merupakan masa dilakukan terminasi terhadap hewan coba sampai dilakukan pemusnahan hewan coba.

4.9.1. Pemeliharaan hewan coba

1. Lima belas hari sebelum hari perlakuan semua populasi dilakukan pemeriksaan fisik untuk mengeliminasi adanya cacat fisik.
2. Hewan coba dipelihara dalam kandang dengan kapasitas yang memadai.
3. Kandang diletakan pada ruangan yang tidak mendapat cahaya matahari langsung.
4. Makanan dan minumann disediakan dengan kualitas dan kuantitas yang baik
5. Suhu ruangan berkisar 25-26⁰ C (suhu ruangan).

4.9.2. Pemusnahan hewan coba

1. Bangkai hewan coba dikumpul dalam suatu wadah yang terbuat dari kain yang dilapisi plastik.
2. Bangkai dikubur bersamaan wadah tanpa plastik dengan kedalaman lebih kurang satu meter.

Penelitian ini telah memilih Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas sebagai lembaga yang akan memberikan pertimbangan etik. Dengan ditunjuknya Komisi Etik Penelitian Kedokteran Universitas Andalas, maka segala sesuatu yang berkaitan dengan semua aspek etika telah diserahkan sepenuhnya ke lembaga ini.

4.10. Analisis data

Hasil analisa di laboratorium yang diperoleh terdiri dari kadar IL-4, IL-10 dan IgE. Data yang diperoleh terdistribusi normal dan variabel independen hanya satu maka analisis yang dipilih adalah analisis univariat satu arah dan setelah itu dilanjutkan dengan Uji Bonferroni. Analisa statistik dinyatakan sangat bermakna bila didapat harga $p < 0,01$.



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1. Karakterisasi Serbuk buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Buah mengkudu sebanyak 11,8 kg diambil di Kecamatan Nanggalo Kota Padang, didapatkan serbuk halus sebanyak 1,216 kg. Karakteristik serbuk yang diperoleh adalah susut pengeringan 11,08%, kadar abu 5,8% dan ukuran partikel terdistribusi sangat kasar, untuk hasil lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 8, 9 dan 10.

5.2. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Skopoletin

Serbuk kering buah mengkudu 960 g ekstraksi dengan metoda sokletasi menggunakan pelarut diklorometan dan diperoleh ekstrak kering sebanyak 11,1 g. Ekstrak kering dimurnikan dengan kromatografi kolom sebagai fase diam digunakan silika gel dan fase geraknya n-heksan: etil asetat (1:4) dan diperoleh senyawa skopoletin belum murni sebanyak 666 mg. Hasil pemurnian senyawa skopoletin dengan kromatografi kolom menggunakan fasa diam *Sephadex LH 20* dan dielusi dengan metanol adalah 99,9 mg. Jadi perolehan senyawa skopoletin dari buah mengkudu adalah 0,01% dari serbuk kering.

Hasil pemeriksaan KLT senyawa skopoletin hasil isolasi dan senyawa skopoletin pembanding (*Extrasynthese* Perancis) dengan eluen n-heksan : etil asetat

(1,5 : 3,5) menunjukkan nilai R_f sama yaitu 0,56. Bentuk kromatogramnya dapat dilihat Gambar 5.1.

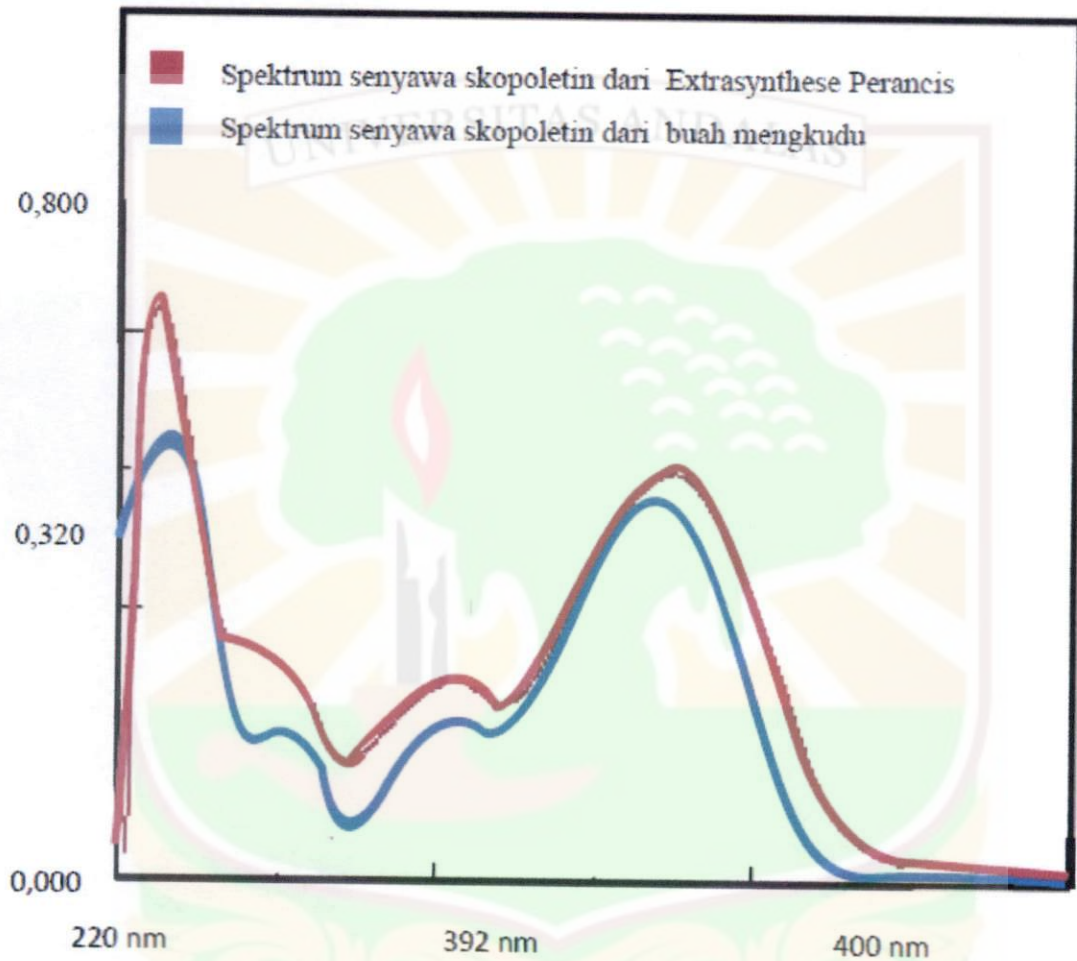


Gambar 5.1. Pola KLT dari senyawa skopoletin dan pembanding dibawah lampu UV_{365} nm.

Keterangan : No 1. skopoletin yang diisolasi dari *Morinda citrifolia* L.
2. skopoletin pembanding (*Extrasynthese* Perancis)

Hasil pemeriksaan spektrum ultraviolet (UV) terhadap skopoletin hasil isolasi memberikan bentuk spektrum yang sama dengan skopoletin pembanding pada serapan maksimum pada panjang gelombang 345,50 nm; 297,00 nm; 253,00 nm dan 228,40 nm. Hasil pemeriksaan spektrum UV dari senyawa skopoletin hasil isolasi dan pembanding dapat dilihat Gambar 5.2. Dari Gambar 5.2 terlihat bahwa puncak-puncak panjang gelombang dari kedua senyawa tersebut adalah sama dan

yang berbeda hanya nilai absorbanya saja. Perbandingan hasil panjang gelombang dan nilai absorban dari kedua senyawa tersebut dapat dilihat Tabel 5.1.

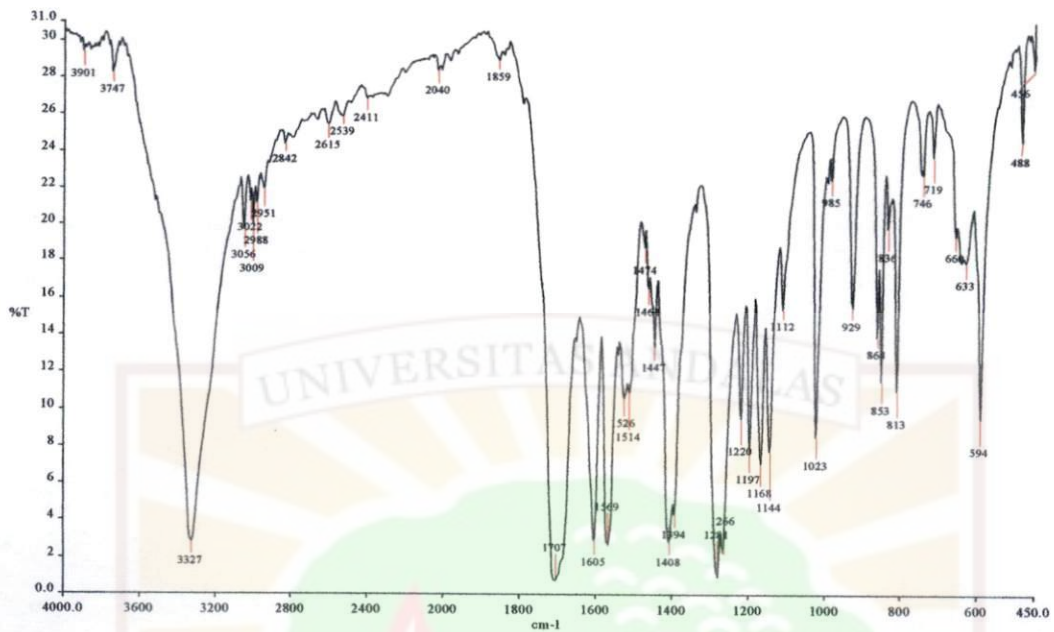


Gambar 5.2. Spektrum UV dari senyawa skopoletin hasil isolasi dari buah mengkudu dan senyawa skopoletin pembanding (*Extrasynthese Perancis*).

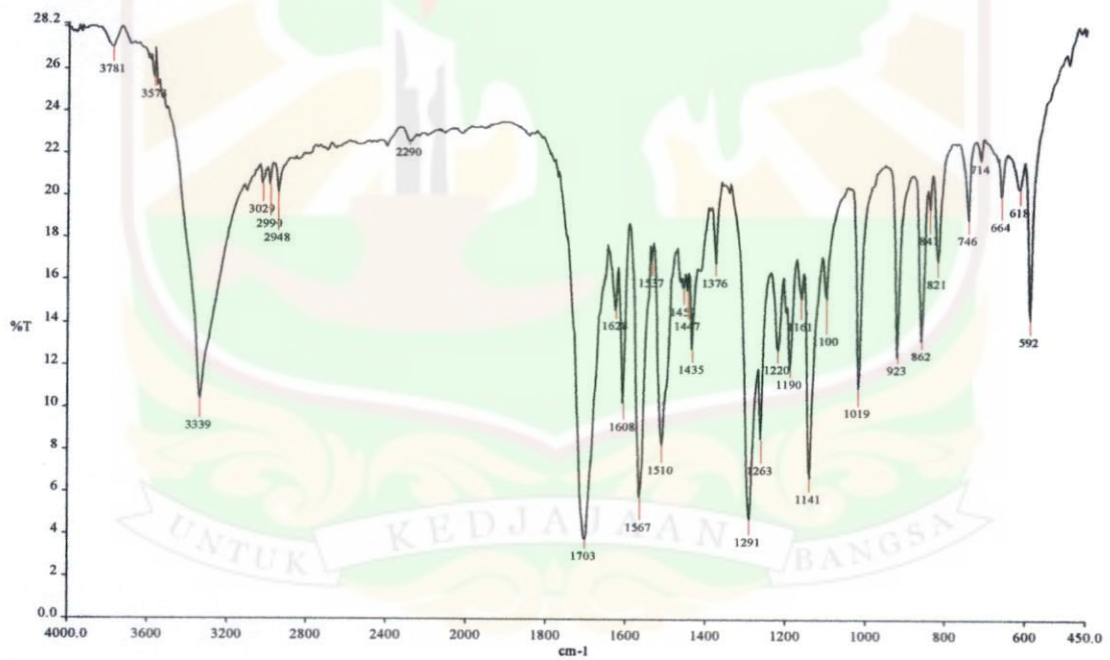
Tabel 5.1. Panjang gelombang (λ) puncak dan absorban skopoletin dari buah mengkudu dan skopoletin perbandingan (*Extrasynthese* Perancis).

No	Panjang gelombang (λ) puncak skopoletin dari <i>Extrasynthese</i> Perancis	Panjang gelombang (λ) puncak skopoletin dari buah mengkudu	Absorban skopoletin dari <i>Extrasynthese</i> Perancis	Absorban skopoletin dari buah mengkudu
1	345,2 nm	345,50nm	0,481	0,411
2	296,0 nm	297,0 nm	0,237	0,151
3	254,0 nm	253,0 nm	0,271	0,119
4	228,6 nm	228,4 nm	0,671	0,423

Pemeriksaan spektrum *infrared* (IR) menunjukkan skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu memiliki spektrum yang sama dengan skopoletin dari *Extrasynthese* Perancis dan hasil spektrumnya dapat dilihat Gambar 5.4 dan Gambar 5.5. Perbandingan bilangan gelombang dan gugus fungsi dari senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu dan senyawa skopoletin perbandingan dari *Extrasynthese* Perancis dapat dilihat Tabel 5.2. Pada Tabel 5.2 terlihat bilangan gelombang yang diberikan oleh senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu dan senyawa skopoletin perbandingan (*Extrasynthese*, Perancis) dari masing masing gugus fungsi hampir sama.



Gambar 5.4. Spektrum IR senyawa skopoletin isolasi dari buah mangkudu.

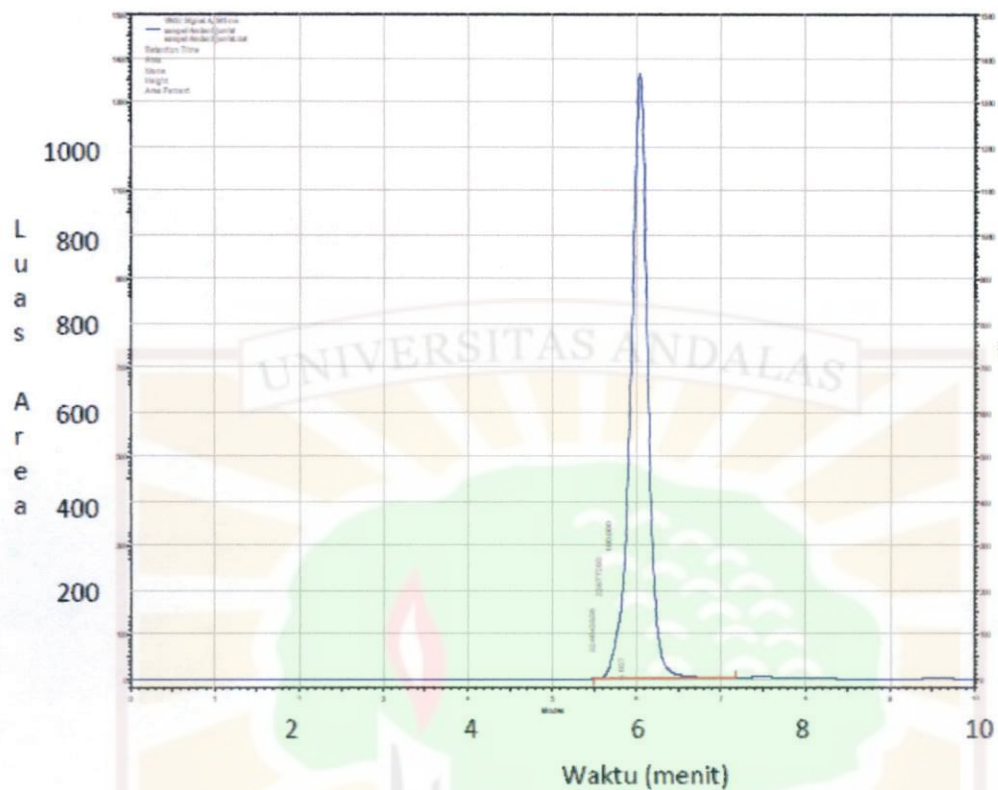


Gambar 5.5. Spektrum IR senyawa skopoletin pembanding (*Extrasyntese Perancis*)

Tabel 5.2. Bilangan gelombang (cm^{-1}) dan gugus fungsi skopoletin dari buah mengkudu dan skopoletin pembanding (*Extrasynthese*, Perancis).

No	Bilangan gelombang (cm^{-1}) skopoletin pembanding	Bilangan gelombang (cm^{-1}) skopoletin dari buah mengkudu	Gugus fungsi
1	3339 (3700-3100)	3327 (3700-3100)	Hidroksi
2	1703 (1900-1650)	1707 (1900-1650)	Keton (karbonil)
3	1608, 1567, 1510 (1600-1450)	1605, 1569, 1514 (1600-1450)	C=C
4	1447, 1435 (1465-1350)	1447, 1408, 1394, (1465-1350)	C-H
5	1220, 1190, 1161, 1141, 1100, 1019 (1250-1000)	1220, 1197, 1168, 1144, 1112, 1023, 985 (1250-1000)	C-O
6	862, 841, 821, 746, 714	864, 853, 813, 746, 719 (900-700)	Disubstitusi aren

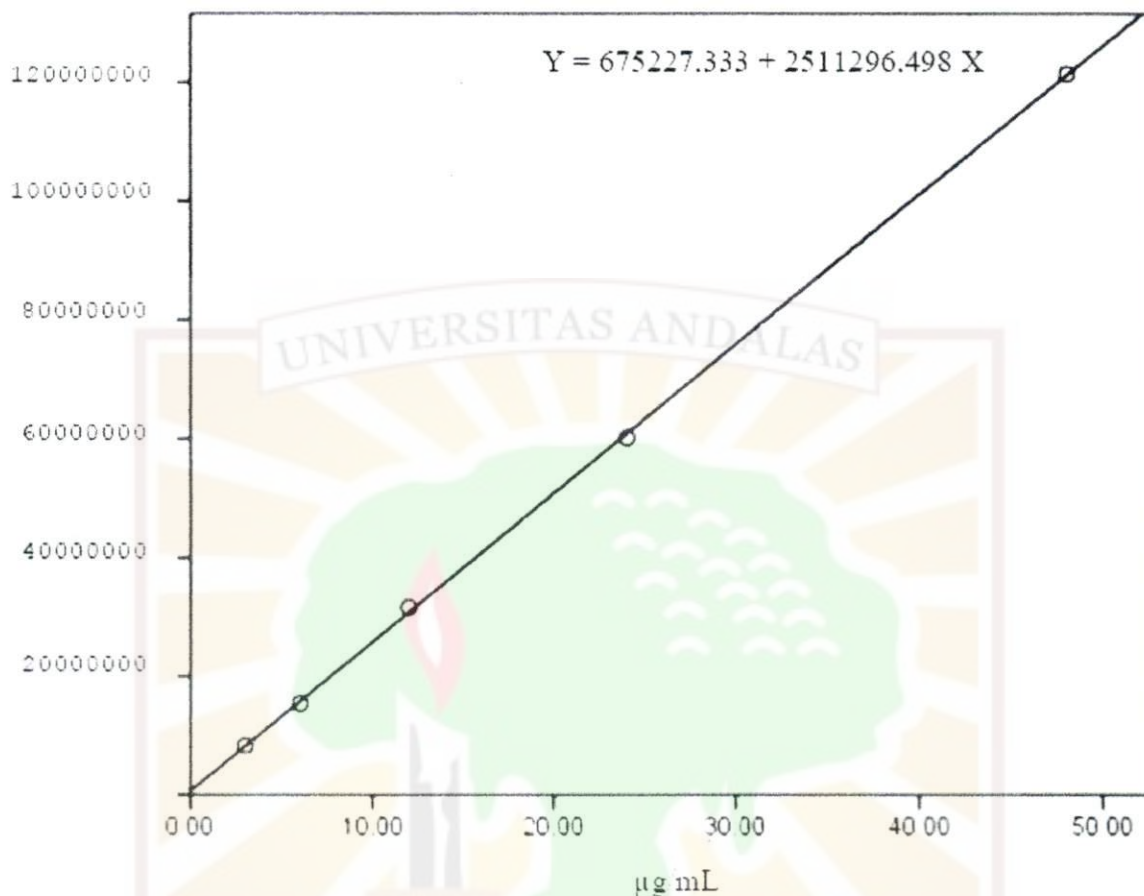
Untuk menentukan tingkat kemurnian senyawa skopoletin hasil isolasi dari buah mengkudu dilakukan dengan HPLC, yaitu mengukur luas area dibawah kurva. Senyawa skopoletin dideteksi pada waktu retensi (R_t) sekitar 6,05 menit. Kromatogram HPLC dari senyawa skopoletin tersebut dapat dilihat Gambar 5.6.



Gambar 5.6. Kurva dari senyawa skopoletin yang diinjeksikan sebanyak 20 μL dengan eluen metanol aquabidest (9:1) laju alir 0,5 mL/menit pada suhu kamar, menggunakan detektor pada panjang gelombang 345 nm.

Tabel 5.3. Hasil pengukuran luas area dari skopoletin standar (*Extrasynthese*, Perancis) pada beberapa konsentrasi.

Nomor	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Luas Area
1	3	8.257.477
2	6	15.415.152
3	12	31.644.464
4	24	60.178.895
5	48	121.430.723



Gambar 5.7. Kurva kalibrasi dari senyawa skopoletin standar (*Extrasynthese*, Perancis).

Senyawa skopoletin pembanding dari *Extrasynthese* Perancis dan dilarutkan dengan metanol. Untuk membuat kurva kalibrasi, senyawa standar dibuat dalam berbagai konsentrasi 3 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$, 24 $\mu\text{g/mL}$, 48 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing sampel tersebut disaring terlebih dahulu sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC, sampel diinjeksikan sebanyak 20 μL . Eluen yang digunakan adalah metanol (9): aquabidest (1) dengan laju alir 0,5 mL/menit pada suhu kamar, menggunakan

detektor pada panjang gelombang 345 nm. Hasil pengukuran luas area pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 5.3. Menggunakan perhitungan persamaan linier dari data pada Tabel 5.3 diperoleh persamaan $Y = 675227,333 + 2511296,498 X$ dan kurva kalibrasinya pada Gambar 5.7. Kurva kalibrasi ini sangat Linier ($p < 0,01$). Skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu dibuat konsentrasinya 43 $\mu\text{g/mL}$ dan didapatkan luas area 113243090. Menggunakan persamaan kurva kalibrasi diperoleh kemurnian dari senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu 104,22%.

5.3. Pengukuran Kadar IL-4

Untuk menentukan kadar IL-4 dalam darah mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I digunakan kit *Mouse IL-4 Platinum ELISA* (eBioscience, BMS613 No. 887944). Dalam menentukan jumlah IL-4, maka dibuat terlebih dahulu kurva standar IL-4 dengan menggunakan senyawa IL-4 standar yang ada didalam kit tersebut pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pengukuran nilai absorban dari IL-4 standar pada berbagai konsentrasi didapatkan hasil seperti Lampiran 13. Dari data nilai absorban IL-4 standar diperoleh kurva standar seperti terlihat pada Lampiran 14. Persamaan garis dari kurva standar IL-4 tersebut adalah $Y = 0,011 X$ dengan nilai $R^2 = 0,952$.

Tabel.5.4. Kadar IL-4 pada serum mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I setelah pemberian senyawa skopoletin dari buah mengkudu pada dosis yang berbeda.

No.	Kelompok Perlakuan	Kadar IL-4 (pg/ml)					Rata rata Kadar IL-4 (pg/ml)
		1	2	3	4	5	
1	I	47,27	34,73	28,36	35,27	28,55	34,84 ± 7,69
2	II	139,64	156,18	123,45	146,91	110,00	135,24 ± 18,51
3	III	84,91	86,91	86,18	76,73	89,64	84,87 ± 4,87
4	IV	82,73	64,18	83,64	64,73	50,73	69,20 ± 13,95
5	V	46,18	52,73	62,36	48,36	63,45	54,62 ± 7,93

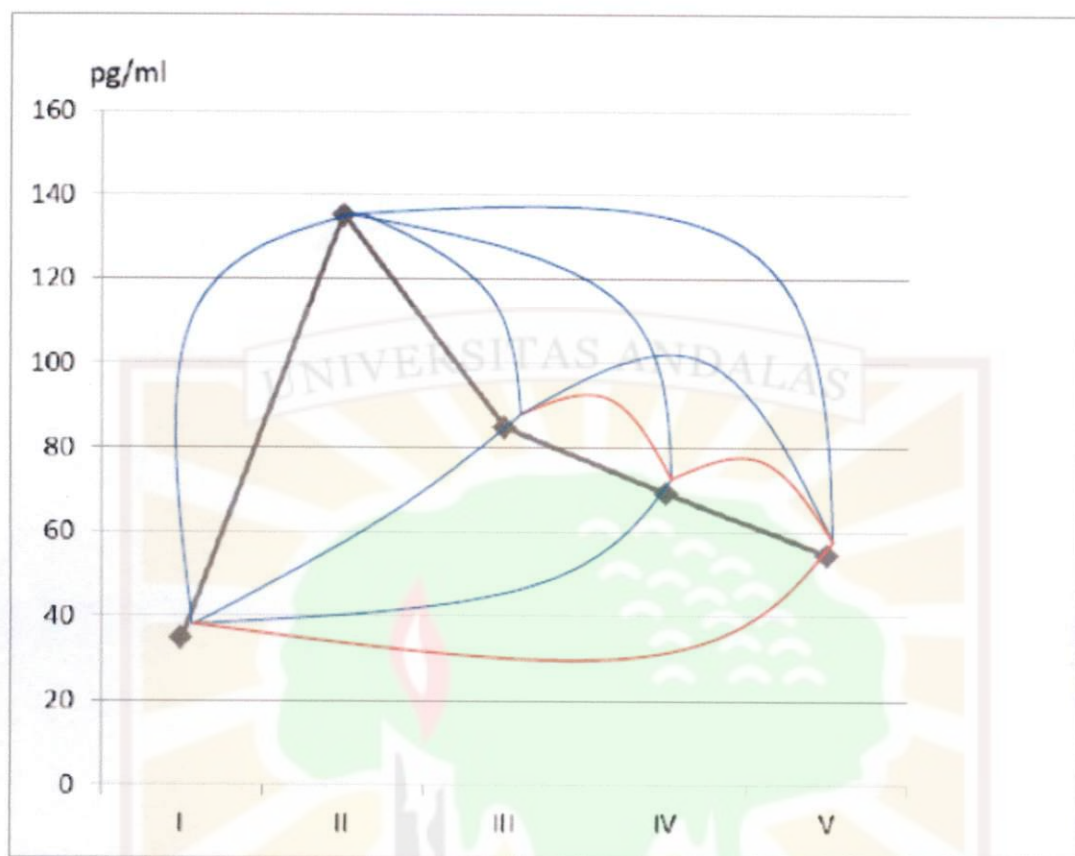
Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.



Gambar 5.8. Hubungan antara dosis senyawa skopoletin dari buah mengkudu yang diberikan pada mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I terhadap kadar IL-4.

Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.

— P < 0,05

— P > 0,05

Darah mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I yang telah diberi senyawa skopoletin pada berbagai konsentrasi ditentukan kadar IL-4 pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pengukuran nilai absorban dari IL-4 yang terkandung di dalam darah

tersebut dapat digunakan untuk menentukan kadar IL-4 dengan menggunakan persamaan $Y = 0,011 X$. Hasil penentuan kadar IL-4 yang terdapat di dalam serum mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I dapat dilihat Tabel 5.7. dan perbandingan kadar IL-4 dari masing-masing kelompok mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I yang diberi senyawa skopoletin pada berbagai dosis dapat dilihat Gambar 5.8.

Menggunakan analisa varian satu arah ternyata pemberian senyawa skopoletin pada dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb dapat menurunkan kadar IL-4 mencit putih jantan yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I sangat berbeda nyata dengan nilai $p < 0,01$ (Lampiran 22).

Bila dibandingkan penurunan kadar IL-4 oleh masing masing dosis, maka dosis 10 mg/kg bb memberikan penurunan yang sangat tinggi, yaitu 54,62 pg/ml, selanjutnya diikuti oleh dosis 3 mg/kg bb sebesar 69,20 pg/ml serta dosis 1 mg/kg bb sebesar 84,87 pg/ml. Mencit normal memiliki kadar IL-4 sebesar 34,84 pg/ml sedangkan keadaan mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I tanpa pemberian senyawa uji (kelompok kontrol positif) sangat tinggi yaitu 135,24 pg/ml. Setelah dilakukan uji lanjut Bonferroni (Lampiran 23), ternyata kadar IL-4 kelompok hewan normal sangat berbeda nyata sekali ($p < 0,01$) dengan kadar IL-4 yang terdapat dalam hewan kelompok kontrol positif. Kelompok mencit hipersensitivitas tipe I yang diberi dosis 1 mg/kg bb dan 3 mg/kg bb setelah uji Lanjut Bonferroni tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) sedangkan dosis 3 mg/kg bb dengan 10 mg/kg bb terjadi perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Kemampuan penurunan IL-4 oleh dosis 10

mg/kg pada mencit hipersensitivitas tipe I dibandingkan dengan kadar IL-4 terhadap kelompok mencit normal dengan uji lanjut Bonferroni sudah sama ($p > 0,05$).

5.4. Pengukuran IL-10

Pengukuran IL-10 dalam serum mencit hipersensitivitas tipe I digunakan kit *Mouse IL-10 Platinum ELISA* (eBioscience, BMS 614/2, No. 887904). Untuk menentukan kadar IL-10, maka dibuat terlebih dahulu kurva standar dengan menggunakan senyawa IL-10 standar yang ada di dalam kit tersebut pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pengukuran nilai absorban dari IL-10 standar didapatkan hasil seperti pada Lampiran 16. Nilai absorban IL-10 standar yang diperoleh dibuat kurva standard dengan persamaan garis $Y = 0,002X$ dan nilai $R^2 = 0,999$. Gambar kurva standar IL-10 tersebut dapat dilihat Lampiran 17.

Selanjutnya darah mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I yang diberi senyawa skopoletin pada berbagai konsentrasi dipisahkan dan ditentukan nilai absorbannya pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pengukuran dari nilai absorban IL-10 dalam serum pada lima kelompok mencit perlakuan dapat dilihat Lampiran 18. Kadar IL-10 dalam serum dari masing-masing mencit perlakuan dari lima kelompok ditentukan dengan menggunakan persamaan $Y = 0,002 X$ dan hasil rata rata untuk kelompok mencit normal 228,20 pg/ml, kelompok mencit hipersensitivitas tipe I tanpa pemberian senyawa uji (kontrol positif) adalah 402,40 pg/ml, pemberian dosis 1 mg/kg

bb adalah 326,60 pg/ml, dosis 3 mg/kg bb adalah 289,60 pg/ml dan pemberian dosis 10 mg/kg bb adalah 286,40 pg/ml. Hasil lengkap dari kadar IL-10 dapat dilihat pada Tabel 5.5. Sedangkan perbandingan masing masing kadar IL-10 dalam serum mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I setelah pemberian senyawa skopoletin pada berbagai dosis dapat dilihat Gambar 5.9.

Pemberian senyawa skopoletin pada dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb pada mencit yang telah mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I terhadap penurunan kadar IL-10 setelah dianalisa secara statistik dengan analisa varian satu arah ternyata dapat menurunkan kadar IL-10 sangat bermakna ($p < 0,01$) (Lampiran 22).

Analisa statistik dilanjutkan dengan uji Bonferroni untuk mengetahui perbedaan kemampuan masing masing dosis dalam menurunkan kadar IL-10. Hasil uji statistik Bonferroni dapat dilihat Lampiran 23. Pemberian senyawa skopoletin pada dosis 1 mg/kg bb terhadap mencit hipersensitivitas tipe I ternyata kadar IL-10 belum terjadi penurunan secara bermakna ($p > 0,05$) bila dibandingkan dengan kadar IL-10 dari mencit kelompok kontrol positif. Kemampuan penurunan kadar IL-10 setelah pemberian dosis 3 mg/kg bb dan 10 mg/kg bb baru bermakna bila di bandingkan dengan kadar IL-10 mencit hipersensitivitas tipe I tanpa pemberian senyawa uji (kontrol positif) ($p < 0,05$). Kemampuan penurunan kadar IL-10 dari mencit hipersensitivitas tipe I setelah pemberian dosis 1 mg/kg bb, 3 mg/kg bb dan 10 mg/kg bb tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$), tetapi berdasarkan hasil uji lanjut Bonferroni pemberian dosis 3 mg/kg bb dan 10 mg/kg bb mampu

menurunkan kadar IL-10 sama dengan kadar IL-10 yang dimiliki oleh hewan normal ($p > 0,05$) (Gambar 5.9).

Tabel 5.5. Jumlah IL-10 pada serum mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I setelah pemberian skopoletin dari buah mengkudu.

No.	Kelompok Perlakuan	Kadar IL-10 (pg/ml)					Rata rata Kadar IL-10 (pg/ml)
		1	2	3	4	5	
1	I	229,00	228,00	189,00	220,00	275,00	228,20 ± 30,80
2	II	364,00	381,00	427,00	413,00	427,00	402,40 ± 28,53
3	III	338,00	279,00	364,00	346,00	306,00	326,60 ± 33,90
4	IV	313,00	236,00	267,00	323,00	309,00	289,60 ± 36,82
5	V	267,00	232,00	263,00	379,00	291,00	286,40 ± 55,86

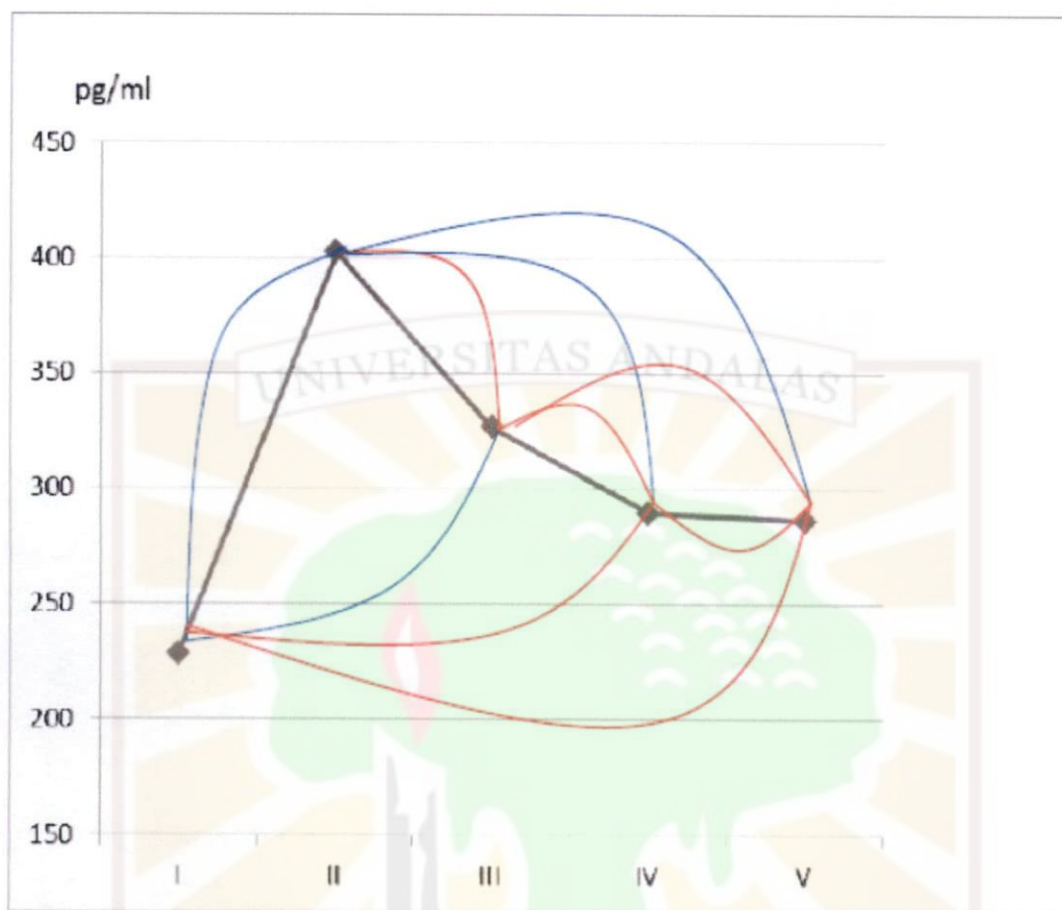
Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.



Gambar 5.9. hubungan antara dosis senyawa skopoletin dari buah mengkudu yang diberikan pada mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I terhadap kadar IL-10.

Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.

— P < 0,05

— P > 0,05

5.5. Pengukuran Kadar IgE

Untuk menentukan kadar IgE dalam serum mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I digunakan kit *Mouse IgE ELISA* (Immunology Consultants Laboratory, Inc. E-90E, Lot#6). Dalam menentukan kadar IgE dalam serum mencit juga dibuat terlebih dahulu kurva standar dengan menggunakan senyawa IgE standar yang ada didalam kit dan pengukuran ini dilakukan pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pengukuran nilai absorban dari IgE standar pada panjang gelombang 450 nm dapat dilihat Lampiran 19. Dari nilai absorban ini dibuat kurva standar. Kurva standar diperoleh persamaan garisnya adalah $Y = 0,008X$ dengan nilai $R^2 = 0,926$ dan gambar persamaan garis tersebut dapat dilihat Lampiran 20.

Serum dari mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I yang telah diberi senyawa skopoletin dipisahkan dan ditentukan kadar IgE dengan metoda ELISA. Dalam menentukan kadar IgE terlebih dahulu diperoleh nilai absorban pada panjang gelombang 450 nm seperti yang terlihat pada Lampiran 21. Dari hasil nilai absorban ini selanjutnya baru ditentukan kadar IgE dalam serum mencit tersebut menggunakan persamaan $Y = 0,008 X$. Hasil pengukuran dari IgE dalam serum mencit hipersensitivitas tipe I secara berurutan adalah; kelompok mencit normal adalah 412,50 ng/ml, kelompok mencit hipersensitivitas tipe I tanpa pemberian senyawa uji (kontrol positif) adalah 1882,25 ng/ml, pemberianm dosis 1 mg/kg bb adalah 1032,25 ng/ml, dosis 3 mg/kg bb adalah 777,25 ng/ml dan dosis 10 mg/kg bb adalah 652,50 ng/ml dan hasil lengkap dari kadar IgE dapat dilihat Tabel 5.6.

Perbandingan kadar IgE dalam serum mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I dengan pemberian dosis senyawa skopoletin dapat dilihat Gambar 5.10.

Tabel 5.6. Jumlah IgE dari serum mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I setelah pemberian skopoletin dari buah mengkudu.

No.	Kelompok Perlakuan	Kadar IgE (ng/ml)					Rata rata Kadar IgE (ng/ml)
		1	2	3	4	5	
1	I	396,25	395,00	435,00	400,00	436,25	412,50± 21,19
2	II	1642,50	2165,00	2161,25	1808,75	1633,75	1882,25±265,72
3	III	1196,25	1191,25	1060,00	711,25	1002,50	1032,25±198,04
4	IV	648,75	916,25	707,50	646,25	967,50	777,25±153,34
5	V	541,25	631,25	630,00	696,25	763,75	652,50±83.10

Keterangan : I. Hewan normal.

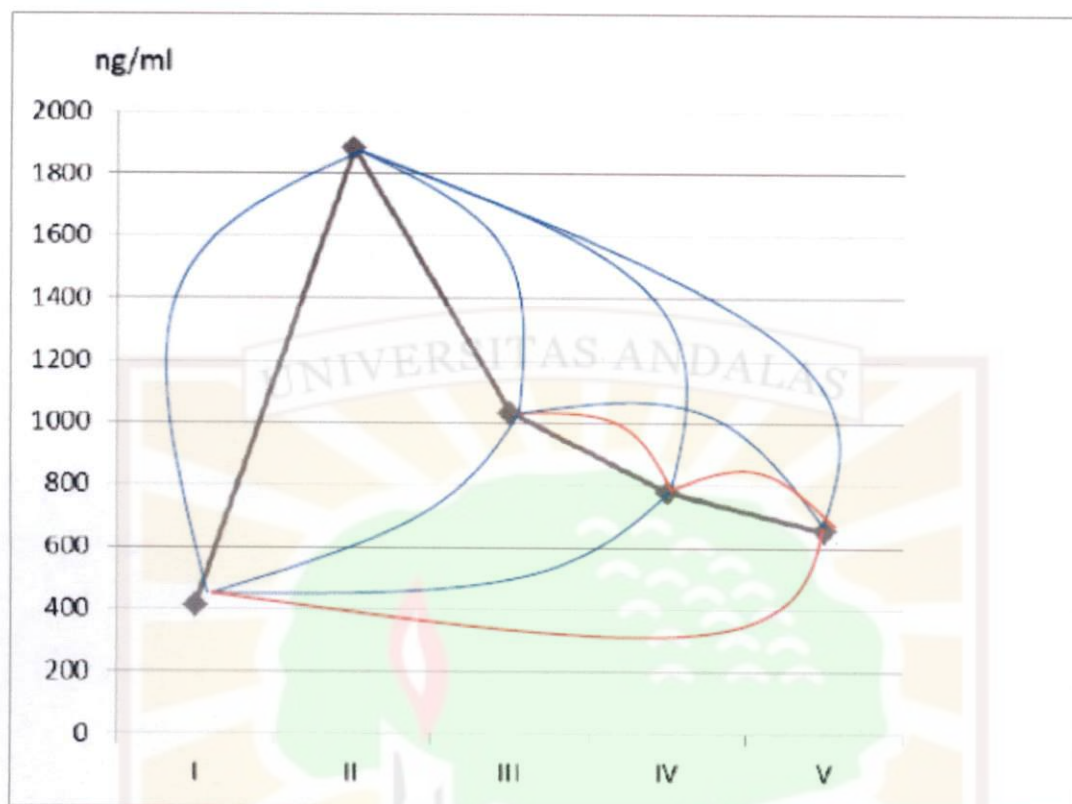
II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.

Hasil uji lanjut Benferroni dapat dilihat Lampiran 23 dan Gambar 5.10. Penurunan kadar IgE yang di akibatkan oleh pemberian skopoletin dosis 1 mg/kg bb pada mencit hipersensitivitas tipe I bila dibandingkan dengan mencit hipersensitivitas tipe I tanpa pemberian senyawa uji (kontrol positif) penurunannya sudah bermakna ($p < 0,05$) begitu juga dengan dosis 3 mg/kg bb dan 10 mg/kgbb. Efek penurunan yang diakibatkan oleh dosis 1 mg/kg bb bila dibandingkan dengan dosis 3 mg/kg bb ternyata tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kata lain sama, sedangkan bila dibandingkan antara dosis 1 mg/kg bb dengan dosis 10 mg/kg bb ternyata terjadi perbedaan secara bermakna ($p < 0,05$). Sedangkan dosis 3 mg/kg bb bila dibandingkan dengan 10 mg/kg bb ternyata secara statistik juga sama ($P > 0,05$). Kemampuan penuruna kadar IgE oleh pemberian skopoletin pada dosis 10 mg/kg bb dari mencit hipersensitivitas tipe I bila di bandingkan dengan kadar IgE mencit normal ternyata tidak terjadi perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Artinya pemberian senyawa skopoletin pada dosis 10 mg/kg bb telah mampu menurunkan kadar IgE mencit hipersensitivitas tipe I sampai pada kadar IgE mencit normal sedangkan dosis 3 mg/kg bb belum mampu menurunkan sampai pada kadar IgE normal ($p > 0,05$).



Gambar 5.10. Hubungan antara dosis senyawa skopoletin dari buah mengkudu yang diberikan pada mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I terhadap kadar IgE.

Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.

— P < 0,05

— P > 0,05

Pemberian senyawa skopoletin pada dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb terhadap mencit hipersensitivitas tipe I setelah dilakukan analisa varian satu arah ternyata senyawa skopoletin mampu menurunkan kadar IgE mencit hipersensitivitas tipe I dengan sangat nyata ($p < 0,01$) hasil perhitungannya dapat dilihat Lampiran 22.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Karakterisasi serbuk buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Pada penelitian ini digunakan senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu karena senyawa skopoletin banyak terkandung dalam tanaman ini dan merupakan komponen utamanya. Buah mengkudu yang sudah matang diiris tipis selanjutnya dikeringkan di rumah kaca dan oven pada suhu 50° C. Buah yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk halus. Serbuk halus yang diperoleh dilakukan pemeriksaan susut pengeringan, kadar abu dan ukuran partikel. Tujuan dari pengukuran ini adalah untuk mengetahui karakter serbuk kering yang digunakan dalam mengisolasi senyawa skopoletin. Bila dilakukan pengulangan, isolasi untuk mendapatkan jumlah senyawa skopoletin yang sama maka karakter serbuk yang digunakan harus sama. Hasil pemeriksaan terhadap susut pengeringan buah mengkudu diperoleh nilainya 11,08%, kadar abu total 5,80% dan ukuran serbuk tergolong dalam serbuk kasar. Farmakope Herbal Indonesia I tahun 2008, telah menetapkan untuk simplesia buah mengkudu nilai susut pengeringan tidak lebih dari 10% dan kadar abu total tidak lebih dari 7,0%. Tingginya nilai susut pengeringan pada simplesia akan mempengaruhi senyawa aktif yang terdapat di dalamnya, jika simplesia tersebut disimpan dalam waktu yang

cukup lama. Pada penelitian ini serbuk yang diperoleh langsung digunakan untuk proses isolasi senyawa skopoletin.

Tujuan menjadikan buah mengkudu kering menjadi serbuk adalah untuk memperbesar luas daerah kontak antara pelarut dengan partikel serbuk, sehingga proses penarikan atau penyarian senyawa aktif akan semakin besar. Ukuran yang terlalu kecil akan menyulitkan dalam proses pemisahan, karena serbuk yang halus akan terbawa kembali ke dalam pelarut.

6.2. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Skopoletin

Proses ekstraksi dipilih adalah metode sokletasi karena cara penyarian dengan metode ini lebih cepat, hasil penyarian lebih sempurna dan pelarut yang digunakan relatif lebih sedikit. Pelarut yang digunakan adalah diklorometan karena diklorometan memiliki titik didih yang rendah (40°C), sehingga siklus pada sokletasi bisa berlangsung lebih cepat dan mengurangi resiko kerusakan senyawa dalam sampel. Dari hasil uji pendahuluan skopoletin dapat diekstraksi langsung dengan diklorometan tanpa penggunaan pelarut lain sebelumnya. Selain itu kelarutan skopoletin tinggi dalam diklorometan, beberapa flavonoid tidak ikut terekstraksi sehingga lebih memudahkan pada saat pemisahannya. Ekstrak diklorometan yang diperoleh, diuapkan pelarutnya *in vacuo*, karena dalam keadaan vakum, tekanan uap pelarut akan turun dan pelarut akan mendidih dibawah titik didihnya, sehingga

proses penguapannya akan lebih cepat dan dapat mengurangi resiko kerusakan senyawa yang termolabil.

Dari serbuk buah mengkudu kering (960 g) diperoleh ekstrak senyawa skopoletin sebanyak 0,01%. Menurut Farmakope Herbal Indonesia I tahun 2008 kandungan senyawa skopoletin di dalam simplisia buah mengkudu (serbuk) tidak kurang dari 0,02%. Ini menunjukkan proses penyarian belum optimal, sehingga senyawa skopoletin yang diperoleh masih relatif sedikit.

Hasil pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dari senyawa skopoletin hasil isolasi dan senyawa skopoletin pembanding (*Exrtasynthase* Perancis) dengan eluen n-heksan: etil asetat (1,5 : 3,5) menunjukkan nilai Rf sama yaitu 0,56. Berdasarkan hasil pemantauan penyebaran noda dengan KLT, kedua senyawa skopoletin memperlihatkan noda pada Rf yang sama dan ini menunjukkan kedua senyawa itu adalah identik.

Pemeriksaan spektrum UV dari senyawa skopoletin hasil isolasi dari buah mengkudu memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 344,00 nm; 295,40 nm; 252,00 nm; 228,20 nm. Sedangkan senyawa skopoletin dari *Exrtasynthase* Perancis memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 345,2 nm, 296,0 nm, 254,0 nm dan 228,6 nm. Bila kedua spektrum ini didempetkan maka terlihat puncak puncak dari panjang gelombangnya tersebut adalah sama (Gambar 5.2). Berdasarkan dari hasil serapan maksimum panjang gelombang yang dimiliki dapat dinyatakan bahwa kedua senyawa tersebut adalah sama.

Pemeriksaan spektrum IR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi suatu senyawa organik. Pemeriksaan terhadap spektrum IR memperlihatkan skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu memiliki gugus fungsi yang sama dengan skopoletin pembanding (Gambar 5.4 dan Gambar 5.5.). Spektrum dari senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu memiliki serapan yang kuat pada bilangan gelombang 3327 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus hidroksi dimana gugus hidroksi ini memberikan pita serapan yang kuat pada daerah $3750\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, serapan pada bilangan gelombang 1707 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil yang memiliki daerah serapan kuat di sekitar 1700 cm^{-1} ($1900\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$), khususnya gugus keton pada bilangan gelombang 1707 cm^{-1} , serapan pada bilangan 1605 cm^{-1} , 1569 cm^{-1} , 1514 cm^{-1} menunjukkan adanya regangan C=C yaitu pada kisaran $1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$. Serapan pada bilangan gelombang 1447 cm^{-1} , 1408 cm^{-1} merupakan daerah pita serapan C-H pada daerah $1465\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$. Serapan pada bilangan gelombang 1220 cm^{-1} , 1197 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} , 1144 cm^{-1} , 1112 cm^{-1} dan 1023 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C – O oksidasi aril pada kisaran $1250\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. Serapan pada bilangan gelombang 985 cm^{-1} , 864 cm^{-1} , 853 cm^{-1} , 813 cm^{-1} , 746 cm^{-1} , dan 719 cm^{-1} merupakan daerah pita serapan substitusi aren yang menyerap pada kisaran $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$. Sedangkan dari senyawa skopoletin pembanding yang di peroleh dari *Exrtasynthase* Perancis didapatkan serapan yang kuat pada bilangan gelombang 3339 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus hidroksi, serapan pada bilangan gelombang 1703 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil/gugus keton, serapan

pada bilangan 1608 cm^{-1} , 1567 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} menunjukkan adanya regangan C=, serapan pada bilangan gelombang 1447 cm^{-1} , 1435 cm^{-1} merupakan daerah pita serapan C-H pada range 1465 cm^{-1} - 1350 cm^{-1} menunjukkan C-H dan serapan pada bilangan gelombang 1220 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} , 1161 cm^{-1} , 1141 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} dan 1019 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C-O oksida serta serapan pada bilangan gelombang 862 cm^{-1} , 841 cm^{-1} , 821 cm^{-1} , 746 cm^{-1} dan 714 cm^{-1} merupakan daerah pita serapan substitusi aromatik. (Noerdin, 1986; Young, 2000). Hasil karakterisasi dari spektrofotometer IR dari senyawa skopoletin hasil isolasi dari buah mengkudu dan senyawa skopoletin pembanding yang diperoleh dari *Extrasynthese*, Perancis untuk lebih jelasnya dapat dilihat Tabel 6.1. Perbedaan hanya terlihat pada bilangan gelombang 1408 cm^{-1} , 1394 cm^{-1} dan 985 cm^{-1} . Dari bilangan gelombang yang ditunjukkan oleh kedua senyawa tersebut, ini menandakan bahwa kedua senyawa tersebut adalah sama yaitu senyawa skopoletin.

Dalam menentukan tingkat kemurnian dari senyawa skopoletin hasil isolasi dari buah mengkudu dilakukan dengan menggunakan metode HPLC, yaitu mengukur luas area dibawah kurva. Pelarut yang digunakan (metanol dan aquabidest) disaring dengan kertas saring Whatman $50\text{ }\mu\text{m}$, agar tidak ada partikel yang terbawa. Kemudian pelarut tersebut di-degassing menggunakan degassor untuk menghilangkan udara yang terlarut agar tidak terbentuk gelembung di dalam kolom HPLC yang dapat mengganggu aliran eluen dan tekanan dalam kolom dengan demikian laju alir eluen dalam kolom akan konstan dan pemisahan berjalan dengan

baik. Masing-masing pelarut metanol dan air suling dimasukkan ke dalam tabung pelarut HPLC. Senyawa skopoletin dideteksi pada waktu retensi (R_t) sekitar 6,05 menit. Kemurnian senyawa skopoletin hasil isolasi dibandingkan dengan senyawa standar, ternyata kemurnian senyawa skopoletin hasil isolasi dari buah mengkudu adalah 104.22%. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa skopoletin hasil isolasi lebih tinggi tingkat kemurniannya dari senyawa skopoletin standar yang di peroleh dari *Exrtasyntase* Perancis.

6.3. Pemilihan dan Sensitisasi Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit putih jantan. Mencit dipilih karena mudah didapat, harganya relatif murah, penanganannya mudah, dan fisiologis tubuhnya mirip dengan manusia (Thompson, 1990). Untuk mengurangi penyimpangan hasil penelitian, maka dipilih mencit dengan galur dan jenis kelamin yang sama serta usia dan berat badan relatif sama. Ini bertujuan agar hewan percobaan yang digunakan sangat homogen, sehingga perubahan yang terjadi adalah betul betul akibat perlakuan percobaan. Sistem kekebalan tubuh juga dipengaruhi oleh hormone estrogen maupun testoteron, maka dipilih mencit jantan karena memiliki hormon yang lebih stabil dari pada mencit betina (Staci, et al., 2001). Sebelum digunakan mencit diaklimatisasi selama 7 hari. Ini bertujuan untuk membiasakan mencit pada kondisi percobaan dan lingkungan serta mengontrol kesehatan dan berat badan serta menyeragamkan makanan. Sehingga perubahan

yang terjadi pada parameter yang diukur benar benar disebabkan oleh perbedaan perlakuan (perbedaan dosis pemberian).

Pada hari pertama, hewan disuntikkan ovalbumin *chicken egg* oval secara intra peritoneal dengan dosis 250 mg/kg bb sebagai antigen. Antigen adalah suatu molekul yang dapat memacu respon imun atau disebut juga imunogen yang dapat merangsang pembentukan antibodi (Kresno, 2003). Ovalbumin adalah salah satu jenis protein bermolekul besar dan merupakan antigen poten alamiah. Kebanyakan protein imunogenik pada umumnya memiliki epitop determinan univalen. Tujuan pemberian antigen ini untuk pertama kalinya adalah untuk mengenalkan antigen tersebut pada sel-sel sistem imun jaringan dan organ yang disebut sistem limfoid. Organ limfoid yang berupa kumpulan nodul kecil yang mengandung banyak limfosit yang merupakan tempat awalnya terjadinya respon imun spesifik terhadap antigen protein yang dibawa melalui sistem limfoid (Bratawidjaja, 2009).

Pengenalan antigen pertama kali dilakukan secara intra peritoneal dengan alasan bahwa rute pemberian ini memberikan sifat imunogenik bagi antigen yang cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena pada jaringan peritoneal banyak terdapat sel makrofag dan sel inilah yang mengawali reaksi sistem imun spesifik. Sel makrofag merupakan sel APC yang memiliki MHC kelas II. Reaksi hipersensitif tipe I diawali dengan kontak alergen dengan sel makrofag. Sel makrofag akan memfagositosis antigen tersebut dan dipecah menjadi beberapa fragmen peptida. Fragmen peptida ini akan diikat oleh molekul MHC kelas II dan selanjutnya di presentasikan ke sel

Tho. Disamping itu sel makrofag melepaskan sitokin berupa IL-1 dan TNF α . Sel Tho akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Proses diferensiasi sel Th kearah Th1 atau Th2 sangat tergantung pada sitokin di dalam lingkungan mikro dimana sel tersebut distimulasi. Bila pada lingkungan tersebut kaya akan IFN γ dan IL-12, maka proliferasi sel Th akan menjadi sel Th1, dan lingkungan yang kaya akan IL-4 akan berpolarisasi menjadi Th2. Pada peristiwa reaksi hipersensitif tipe I antigen juga ditangkap oleh sel mastosit dan sel basofil dan selanjutnya sel ini akan melepaskan sitokin IL-4. IL-4 yang tinggi ini akan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel Th2. Sel Th 2 menghasilkan IL-2, IL4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13 sehingga IL-4 semakin tinggi kadarnya. IL-4 mempunyai reseptor pada permukaan sel limposit B dan sel ini akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma, aktivitas akan semakin meningkat dengan adanya IL-10 dan menghambat proliferasi dan diferensiasi sel Tho menjadi sel Th1 (Kang, et al., 1999; Burtis, et al., 2006).

Pemberian antigen untuk ke dua kalinya pada hari ketiga secara subkutan bertujuan untuk melihat apakah antibodi IgE sudah terbentuk. Pembentukan antibodi IgE ditandai dengan timbulnya warna merah di tempat penyuntikan. Ternyata setelah dilakukan pengamatan tanda tersebut belum kelihatan dan muncul reaksi hipersensitivitas tipe I setelah penyuntikan dengan antigen pada hari ke tujuh. Reaksi hipersensitivitas tipe I muncul setelah pemberian antigen berulang. Pada pemberian antigen kedua, yang terjadi adalah untuk peningkatan sensitifitas dari sistem imun

hewan terhadap antigen, sehingga terjadi peningkatan jumlah sitokin dan sel memori. Pada hari ketujuh pembentukan IgE sudah tinggi dan reaksi hipersensitivitas tipe I sudah terlihat (Kikuchi, et al., 2006). Pada hari ketujuh hewan diberikan ovalbumin 250 mg/kg bb secara subkutan dan hewan yang memberikan reaksi hipersensitivitas tipe I ditandai dengan warna kemerahan di sekitar suntikan pemberian ovalbumin. Reaksi kemerahan terjadi akibat ikatan antara antigen ovalbumin dengan IgE yang telah terikat pada permukaan sel mastosit dan sel basofil. IgE merupakan faktor terpenting dan berperan besar pada reaksi anafilaktik yang disebut antibodi homositotropik atau reagin. IgE mempunyai afinitas yang tinggi pada sel mastosit dan sel basofil, melalui reseptor Fc pada permukaan sel bersangkutan mengikat IgE pada fragmen Fc. Bila antigen yang sama masuk untuk kedua kalinya maka satu molekul antigen akan berikatan dengan 2 molekul IgE yang berdekatan pada fragmen Fab. Terbentuknya kompleks antara antigen dengan 2 molekul IgE yang terikat pada permukaan sel mastosit dan sel basofil akan memicu aktivitas enzimatik dalam membran sel tersebut dan selanjutnya terjadi pelepasan mediator-mediator kimia yang tersimpan pada granula dalam sel mastosit dan sel basofil seperti histamine, bradikinin, prostaglandin, leukotrien dan lain sebagainya. Mediator ini bertanggung jawab terhadap timbulnya reaksi hipersensitivitas tipe I. Mediator histamine, prostaglandin dan leukotrien, secara kolektif mengakibatkan peningkatan permeabilitas kapiler, vasodilatasi, kontraksi otot polos bronkus dan saluran cerna serta inflamasi lokal.

Skopoletin disuspensikan di dalam NaCMC 1%, karena skopoletin sukar larut dalam air. Pensuspensi yang digunakan adalah NaCMC, karena senyawa ini bersifat iner dan tidak mempengaruhi sistim imunitas tubuh hewan percobaan serta senyawa ini mampu mendispersikan dengan homogen senyawa skopoletin yang akan diberikan pada mencit percobaan. Larutan yang terdispersi homogen akan memiliki senyawa skopoletin yang sama di setiap bahagian, sehingga pada waktu pengambilan dengan jarum suntik dari wadah dan diberikan kepada hewan mencit secara oral akan sama.

Dosis skopoletin yang diberikan pada hewan mencit yaitu 1 mg/kg BB, 3 mg/kg bb dan 10 mg/kg BB mencit. Pemberian dosis ini berdasarkan dari uji pendahuluan, dimana pada uji pendahuluan dosis minimal yang memberikan efek menghambat reaksi hipersensitivitas tipe I adalah 1 mg/kg bb dan dosis maksimal yang memberikan efek adalah 10 mg/ kg bb. Pengambilan dosis 3 mg/kg bb adalah berdasarkan perhitungan rumus variasi dosis (Thompson, 1990).

6.4. Pengukuran Kadar IL-4

Kadar IL-4 mencit yang mengalami hipersensitivitas tipe I setelah pemberian antigen secara subkutan tanpa pemberian senyawa uji (kelompok kontrol positif) setelah 24 jam meningkat menjadi $135,24 \pm 18,51$ pg/ml dan kenaikan ini bila dibandingkan dengan hewan normal adalah 388,17 %. Hal ini menunjukkan pemberian antigen setelah hewan mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I akan

meningkatkan produksi sitokin jenis IL-4 yang bertanggung jawab dalam menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe I. IL-4 mempunyai fungsi utama dalam meregulator respon imun yang diperantarai oleh IgE dan sel mastosit atau eusinofil. Aktivitas IL-4 tidak terbatas pada sel B, tapi juga pada sel T, makrofag, granulosit, mastosit, prekursor eritrosit dan megakariosit. IL-4 terhadap sel Th2 bertindak sebagai stimulator, menghambat aktivitas makrofag dan efek ini dapat dilawan oleh $\text{INF}\gamma$ (Kresno,2003; Burtis, et al., 2006).

Tingginya kadar IL-4 dalam tubuh hewan yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I akan mempengaruhi aktivitas sel T CD4, dimana sel ini akan mengalami proliferasi dan diferensiasi ke arah sel Th2. Selanjutnya IL-4 mempunyai reseptor di sel plasma dan sel ini akan aktif memproduksi IgE. Bila terjadi penurunan kadar IL-4, tentu saja produksi IgE juga akan menurun (Kang, et al., 1999; Burtis, *et al.*, 2006).

Pemberian senyawa skopoletin dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb pada mencit hipersensitivitas tipe I dapat menurunkan kadar IL-4 mencit putih jantan yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I sangat berbeda nyata ($p < 0,01$). Penurunan kadar IL-4 dalam serum mencit hipersensitivitas tipe I akan berdampak langsung kepada sel Tho dan sel plasma sehingga produk IgE akan menurun.

Bila dilihat penurunan kadar IL-4 yang diakibatkan oleh pemberian masing masing dosis, maka dosis 10 mg/kg bb memberikan penurunan yang sangat tinggi, yaitu 40,39% dari keadaan mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I

tanpa pemberian senyawa uji (kelompok kontrol positif) dan efek yang paling rendah menurunkan kadar IL-4 adalah dosis 1 mg/kg bb. Dari hasil uji lanjut Bonferroni terlihat bahwa dosis 10 mg/kg bb sudah sama dengan kadar IL-4 mencit normal artinya dosis 10 mg/kg bb sudah maksimal dalam penurunan kadar IL-4 mencit yang mengalami hipersensitivitas tipe I. Tapi dosis ini perlu dikaji lebih lanjut sehingga diperoleh dosis yang optimum dalam menurunkan kadar IL-10 tanpa menimbulkan efek samping yang tidak diharapkan.

Pengobatan reaksi alergi dapat dilakukan salah satunya dengan menyeimbangkan proliferasi dan diferensiasi sel Th0 menjadi sel Th1 dan sel Th2. Dalam keadaan alergi arah proliferasi dan diferensiasi dari sel Th0 sangat tinggi menjadi sel Th2. Untuk itu dalam keadaan alergi dilakukan penginduksian aktifitas kearah sel Th1, sehingga produksi $INF\gamma$, IL-12 dan IL-18 menjadi tinggi, dimana kelompok sitokin ini akan menghambat kerja dari sel Th2 terutama dalam memproduksi IL-4. Pemakaian vaksin BCG yang dikombinasi dengan *Mycobacterium vaccae* telah terbukti meningkatkan aktivitas sel Th1 dan menurunkan reaksi alergi (Wohlleben, 2007).

6.5. Pengukuran IL-10

Kadar IL-10 pada kelompok mencit normal adalah $228,20 \pm 30,80$ pg/ml. Bila hewan mencit telah mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I dengan tanpa pemberian senyawa uji (kontrol positif), naik menjadi 176 % dari kadar normal).

Peningkatan kadar IL-10 pada mencit hipersensitivitas tipe I ini kenaikannya tidak setinggi bila dibandingkan dengan kadar IL-4.

Tingginya kadar IL-10 dalam tubuh hewan yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I juga akan mempengaruhi aktivitas sel T CD4 sama dengan IL-4, dimana sel ini akan mengalami proliferasi dan diferensiasi ke arah sel Th2 (Kang, 2005). Disamping itu IL-10 juga mampu menghambat produksi sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 dan menghambat fungsi dari sel monosit atau makrofag (Kearly, et al., 2005). Pemberian senyawa skopoletin pada dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb pada mencit yang telah mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I terhadap penurunan kadar IL-10 setelah dianalisa secara statistik dengan analisa varian satu arah ternyata dapat menurunkan kadar IL-10 sangat berbeda nyata ($p < 0,01$). Penurunan kadar IL-10 pada mencit hipersensitivitas tipe I akan memperbaiki keseimbangan proliferasi dan diferensiasi sel TCD4 dan selanjutnya produksi IL-4 oleh sel Th2 akan menurun.

Kenaikan kadar IL-10 pada mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tidak begitu tinggi bila dibandingkan dengan kenaikan kadar IL-4 dan begitu juga penurunan kadar IL-10 yang diakibatkan oleh senyawa skopoletin juga lemah. Kemampuan penurunan IL-10 dari mencit hipersensitivitas pada dosis 1 mg/kg bb belum bermakna ($p > 0,05$) bila dibandingkan dengan mencit hipersensitivitas tipe I yang tidak diberi senyawa uji. Sedangkan terhadap pemberian dosis 3 mg/kg bb dan 10 mg/kg bb baru bermakna ($p < 0,05$). Artinya dosis 1 mg/kg bb belum mempunyai

efek dan efek terlihat baru pada dosis 3 mg/kg bb. dan dosis 10 mg/kg bb. Tapi secara statistik kemampuan penurunan kadar IL-10 yang diberikan oleh dosis 1 mg/kgbb adalah sama dengan kemampuan penurunan kadar IL-10 yang diberikan dosis 3 mg/kg bb. dan dosis 10 mg/kg bb. Kemampuan penurunan kadar IL-10 dari mencit hipensensitivitas tipe I oleh dosis 3 mg/kg bb bila dan 10 mg/kg bb. bisa sampai ke kadar IL-10 hewan normal ($p>0,05$). Dalam hal ini terlihat bahwa pemberian dosis 3 mg/kg bb telah mampu menurunkan sampai pada kadar normal dan pemberian pada dosis 10 mg/kg bb. tidak perlu dilanjutkan karena secara statistik efeknya sama.

Bila dibandingkan efek senyawa skopoletin terhadap kadar IL-4 dan IL-10 ternyata secara statistik dengan analisa varian satu arah, sama sama memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata ($p<0,01$) tetapi senyawa skopoletin pada dosis 1 mg/kg bb lebih kuat kerjanya menekan kadar IL-4 bila dibandingkan kadar IL-10. Hal ini terbukti dengan pemberian dosis 1 mg/kg bb sudah terdapat perbedaan secara bermakna ($p< 0,05$) terhadap penurunan kadar IL-4 bila dibandingkan dengan kadar mencit hipersensitivitas tipe I yang tidak diberi senyawa skopoletin (kontrol positif). Pada dosis 3 mg/kg bb efek penurunan kadar IL-10 sudah sama dengan kadar IL-10 kelompok mencit normal sedangkan untuk kadar IL-4 baru bisa mencapai normal pada dosis 10 mg/kg bb.

6.6. Pengukuran IgE

Kadar IgE mencit yang mengalami hipersensitivitas tipe I tanpa pemberian senyawa uji (kelompok kontrol positif) bila dibandingkan dengan mencit normal dimana kadarnya meningkat sangat tinggi yaitu 456,30%. Hal ini membuktikan bahwa hewan yang telah mengalami hipersensitivitas tipe I, sistem imunnya telah mengenali antigen dan selanjutnya sel plasma akan menghasilkan IgE yang sangat tinggi (Kikuchi, et al., 2006).

Pemberian senyawa skopoletin pada dosis 1, 3 dan 10 mg/kg bb kepada mencit hipersensitivitas tipe I setelah dilakukan analisa varian satu arah ternyata senyawa skopoletin mampu menurunkan kadar IgE dengan sangat nyata ($p < 0,01$). Bila dilihat efek penurunan kadar IgE oleh pemberian senyawa skopoletin dari masing masing dosis dari hasil uji lanjut Benferroni terlihat penurunan kadar IgE yang diakibatkan oleh pemberian skopoletin dosis 1 mg/kg bb pada mencit hipersensitivitas tipe I bila dibandingkan dengan mencit kontrol positif (mencit hipersensitivitas tipe I tanpa pemberian senyawa uji) penurunannya sudah bermakna $p < 0,05$ begitu juga dengan dosis 3 mg/kg bb dan 10 mg/kg bb. Efek penurunan yang diakibatkan oleh dosis 1 mg/kg bb bila dibandingkan dengan dosis 3 mg/kg bb ternyata tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kata lain sama, sedangkan bila dibandingkan antara dosis 1 mg/kg bb dengan dosis 10 mg/kg bb ternyata terjadi perbedaan secara bermakna ($p < 0,05$). Bila dosis 3 mg/kg bb dibandingkan dengan dosis 10 mg/kg bb ternyata secara statistik juga sama ($P > 0,05$). Kemampuan

penurunan kadar IgE oleh pemberian skopoletin pada dosis 10 mg/kg bb dari mencit hipersensitivitas tipe I bila di bandingkan dengan kadar IgE mencit normal ternyata tidak terjadi perbedaan yang bermakna ($p>0,05$). Artinya pemberian senyawa skopoletin pada dosis 10 mg/kg bb telah mampu menurunkan kadar IgE mencit hipersensitivitas tipe I sampai pada kadar IgE mencit normal sedangkan dosis 3 mg/kg bb belum mampu menurunkan sampai pada kadar IgE normal ($p>0,05$). Dari uji lanjut Benferroni dapat disimpulkan bahwa pemberian skopoletin pada dosis 10 mg/kg bb baru mampu menurunkan kadar IgE sampai kadar IgE mencit normal.

Bila dibandingkan efek yang ditimbulkan oleh senyawa skopoletin terhadap kadar IL-4, IL-10 dan IgE mencit hipersensitivitas tipe I ternyata ada korelasinya, dimana dengan turunnya kadar IL-4 dan IL-10 maka kadar IgE juga akan turun. Bila dilihat pengaruh masing masing dosis dengan kadar IL-4 dan kadar IgE ternyata sama, yaitu sudah dapat menurunkan secara bermakna pada dosis 1 mg/kg bb dan pada dosis 10 mg/kg bb sudah dapat menurunkan kadar IL-4 dan IgE sampai pada kadar hewan yang normal.

Pada mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I ternyata kenaikan kadar IgE paling tinggi yaitu 456,30 %, kemudian disusul oleh kadar IL-4 yaitu 388,17 % dan yang paling kecil kenaikannya adalah kadar IL-10 yaitu 176 %. Ini membuktikan bahwa pada reaksi hipersensitivitas tipe I yang berperan penting adalah IgE dan sitokin yang mengaturnya IL-4 (Kikuchi, et al., 2006). Penurunan kadar IL-4, diperkirakan melalui penurunan aktivitas sel Th2, aktivitas sel makrofag

atau melalui penekanan aktivitas sel eosinofil, karena semua sel tersebut memproduksi IL-4. Penekanan aktivitas sel makrofag bisa saja langsung terhadap produksi IL-4, tapi bisa juga melalui penekanan produksi IL-1, karena IL-1 berperan penting juga dalam diferensiasi sel Tho menjadi sel Th2 dan Th1.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Hasil penelitian telah dilakukan terhadap pemberian senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu pada mencit yang mengalami reaksi hipersensitivitas tipe I, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

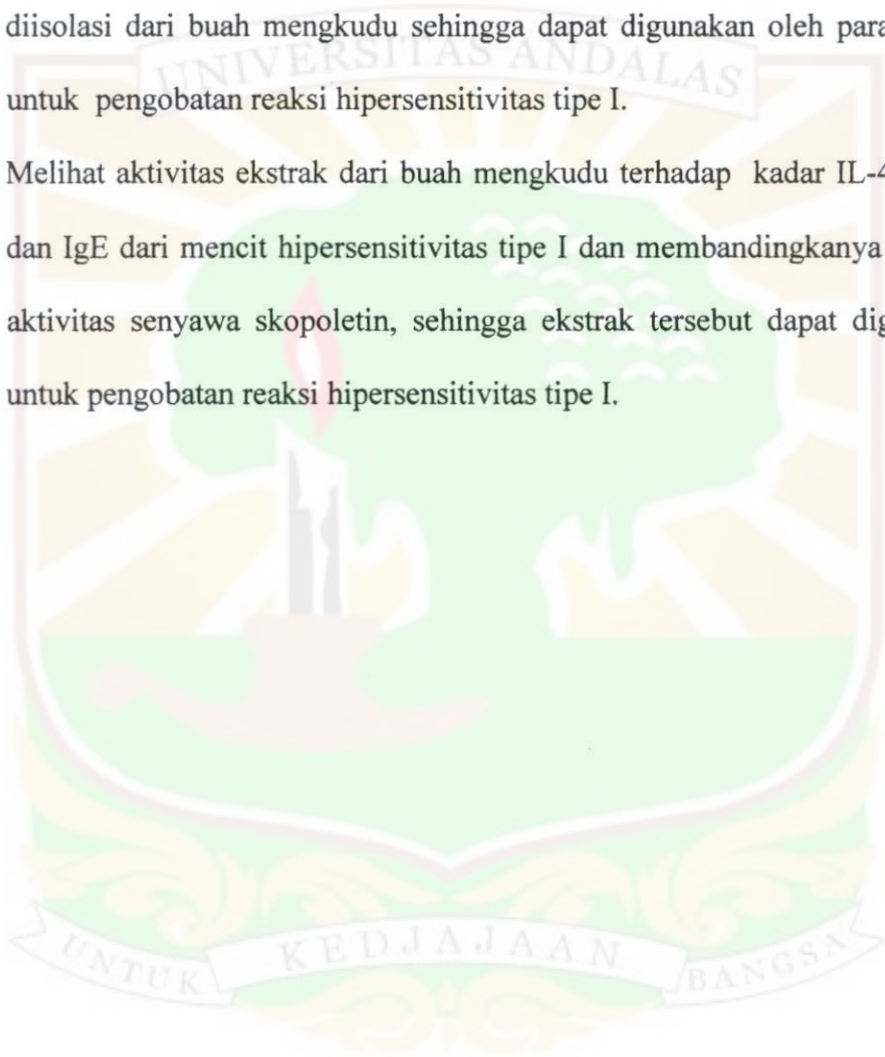
1. Pemberian skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu dapat menurunkan kadar IL-4 mencit hipersensitivitas tipe I.
2. Pemberian skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu dapat menurunkan kadar IL-10 mencit hipersensitivitas tipe I.
3. Pemberian skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu dapat menurunkan kadar IgE mencit hipersensitivitas tipe I.

7.2. Saran

Untuk penelitian selanjutnya disarankan :

1. Menentukan dosis optimum dari senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu yang dapat menurunkan kadar IL-4, IL-10 dan IgE dari mencit hipersensitivitas tipe I tanpa menimbulkan efek samping.

2. Melihat pengaruh senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu terhadap sitokin yang mempunyai efek inflamasi pada mencit hipersensitivitas tipe I.
3. Melakukan uji preklinis dan uji klinis dari senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu sehingga dapat digunakan oleh para klinisi untuk pengobatan reaksi hipersensitivitas tipe I.
4. Melihat aktivitas ekstrak dari buah mengkudu terhadap kadar IL-4, IL-10 dan IgE dari mencit hipersensitivitas tipe I dan membandingkannya dengan aktivitas senyawa skopoletin, sehingga ekstrak tersebut dapat digunakan untuk pengobatan reaksi hipersensitivitas tipe I.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK and AH Lichtman, 2004. Basic Immunology, 2nd ed, Elsevier, California,193-207.
- Abbas AK and AH Lichtman, 2009. Celluler and Mollecular Immunology, 6th. Ed.Philadelphia, W.B. Sounder Co. 432-452.
- Adfa M, 2006. 6-Metoksi,7-Hidroksi Kumarin dari Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.), *Jurnal Gradien*, 2;183-186.
- Akihisa T, Matsumoto K, Tokuda H, Yasukawa K, Seino KI, Nakamoto K, Kunitaga H, Suzuki T, Kimura Y, 2007 Anti-inflammatory and Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J. Nat. Prod.* 70;754-757.
- Aldi Y, D Camela dan Y Lisawati, 2003. Aktivitas Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Reaksi Anafilaksis Kutan Aktif pada Mencit Putih Jantan, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesi, Yayasan Perintis Padang.
- Aldi Y, Roni dan S Dharma, 2006. Pengaruh Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Degranulasi Mastosit, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesi, Yayasan Perintis Padang.
- Aldi Y, D Amalia dan Y Ilyas, 2007. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Peningkatan Antibodi dan Jumlah sel Leukosit Pada Mencit Putih Jantan, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesi, Yayasan Perintis Padang.
- Aldi Y, Hafizni dan Suhatri, 2007. Uji Efek Antiinflamasi Ektrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) secara Topikal dan Pengaruhnya Terhadap Volume Eksudat, Farmasi FMIPA Universitas Andalas Padang.
- Alegantina S dan A Isnawati, 2010. Identification and Setting Level Coumpounds for Kumarin in the Methanol Exstract *Artemisia annual* L. by Thin Layer Chromatographydensitometry, *Bul. Peneliti Kesehatan*, 38(1);17-28.
- Anonim, 2004. Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Volume I, Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.

- Backer CA and RC Bakhuizen, 1968. Flora of Java, Vol II, Bishen Singh Mahendra Pal Singh, 351.
- Bangun AP dan B Sarwono, 2005. Khasiat Dan Manfaat Mengkudu., Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Bayoumi SAL, MG Rowan, MG Blagbrough and JR Beeching, 2008, Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: The E-Z-isomerisation stage. *Phytochemistry*, 69, 17, 2928-2936.
- Bratawidjaja KG, 2009. Imunologi Dasar, Edisi 8. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Beacker CA and BV Brink, 1968. Flora of Java, II. N.V.P, Noodhot Groningen, Nederlands.
- Bellavite, PA Conforti, F Pontarollo and Ortolani, 2006. Immunology and Homeopathy; Cells of the immune system and inflammation *Evid Based Complement Altern Med.* 3;13-24
- Berger W, 2005. Allergy and Immunology; Research may lead to new therapies for allergic rhinitis *Immunotherapy Weekly.* Atlanta.21;2.
- Bochner BS and WW Busse, 2005. Allergy and Asthma *J Allergy Clin Immunol*; 115:953-9.
- Bukhsh ARK, SS Bhattacharyya, S Paul dan N Boujedani, 2010. Polymeric Nanoparticle Encapsulation of a Naturally Occuring Plant Scopoletin and Its Effects on Human Melanoma Cell A 375. *Journal to chinese integrative medicine*, 8(9);853-862.
- Burtis CA, ER Ashwood and DE Bruns, 2006. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed., Elsevier Inc. USA, Washington, D.C. 645-723.
- Copriyadi J, E Yasmi dan Hidayati, 2005. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Kumarin dari Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC.). *Jurnal Biogenesis.* 2(1);13-15.

- Carpinella MC, CG Ferravoli dan SM Palacios, 2005. Antifungal Synergistic Effect of Scopoletin, a Hydroxycoumarin Isolated from *Melia azedarach* L. Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(8);2922-2927.
- Corner EJH and K Watanabe, 1969. Illustrated Guide to Tropical Plants, Hirokawa Publishing Company, Tokyo, 699.
- Dalsgaard PW, O Potterat, F Dieterle, T Paululat, T Kuhn, M Hamburger, 2006. Nonioside E-H, New Trisaccharide Fatty Acid Esters from the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *Planta Med*. 72;1322-1327.
- Deng S, AK Palu, BJ West, CX Su, BN Zhou, JC Jensen, 2007. Lipoxigenase Inhibitory Constituents of the Fruits of Noni (*Morinda citrifolia*) Collected in Tahiti. *J. Nat. Prod*. 70;859-862.
- Depkes, 2008. Farmakope Herbal Indonesia, Edisi I, Departemen Kesehatan republik Indonesi, Jakarta, 93-97.
- Ding ZQ, DYue and WZ Tao, 2005. Hypouricemic Action of Scopoletin Arising from Xanthine Oxidase Inhibition and Uricosuric Activity, *Planta Medica*. 71(2);83-185.
- Dipiro JT, RL Tabert, GC Yee, GR Matzke, BG Wells, LM Posey, 2008. Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach, 7th Ed. Mc Graw-Hill, Medical Publishing Division, New York. 463-489, 1417-1430.
- Eales LJ, 2003. Immunology, 2nd ed, John Wella and Sons, England, p. 159-164.
- Farine JP, L Legal, B Moreteu and JL Quere, 1996. Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophilla*. *Phytochemistry*. 41(2);433-438.
- Fu H, W Huang, W Tseng, S Wang and Y Liu, 2004. Effect of Juice from *Morinda citrifolia* (noni) on Gastric Emptying in Male Rats, *Chinese Journal of Physiology*. 47(4);169-174.
- Furusawa E, A Hirazumi, S Story and J Jensen, 2003. Antitumour Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180 Ascites Tumour in Mice, *Phytother Res*, 17(10);1158-1164.

- Goleva E, ID Cardona and DY Leung, 2005. Factors That Regulate Naturally Occurring T Regulatory Cell-Mediated Suppression, *J Allergy Clin Immunol.* 116: 1094–100.
- Grütz G, 2005. New Insights into the Molecular Mechanism of Interleukin-10 Mediated Immunosuppression, *Journal of Leukocyte Biology*, 77;3-15.
- Handerson CP and IR Handcock, 1989. A Guide to the Useful Plant of Solomon Island. Solomon Island: Ministry of Agriculture and Lands.
- Harborne JB, 1959. Plant Polyphenols 2: The Coumarins of *Solanum pinnatisectum.*, *Biochem Journal*, 74;270-273.
- Hyung JK, J Seon, JK Young, TC Hun, GY Yong, HK Tai, et al., 2004. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE₂ from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia*. 75(3); 261-266.
- Haiqing Y, L Shiming, H Mou-Tuan and H Chi-Tang, 2008. Antiinflammatory Constituents in Noni (*Morinda citrifolia*). *Journal of Dietary Supplements*. 12;179-190.
- Hanafiah KA, 1997. Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Palembang.
- Heyne K, 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. (Jilid III). Penerjemah: Badan Litbang Kehutanan. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan, Jakarta.
- Helmy M dan Z Munasir, 2007. Pemakaian Cetirizine dan Kortikosteroid pada Penyakit Alergi Anak, *Dexa Media*, 20(2):68-73.
- Hirazumi A and Furusawa, 1999. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity, *Phytother Res.* 13(5):380-7.
- Hornick CA, A Myers, KH Sadowska, CT Anthony and EA Woltering, 2003. Inhibition of Angiogenic Initiation and Disruption of Newly Established Human Vascular Networks by Juice from *Morinda citrifolia* (noni), *Angiogenesis*. 6(2);143-149.
- Hyung JK, SI Jang, YJ Kim, HT Chung, Y GaYun, TH Kang, et al., 2006. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE₂ from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells, *Fitoterapia*, 75;3-4.

- Issell BF, A Franke and RM Fielding, 2008. Pharmacokinetic Study of Noni Fruit Extract. *Journal Of Dietary Supplements*, 5; 373-382.
- Janeway CA, 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Marion Morrow, Rory MacDonald Garland Publishing.
- Jayaraman SK, MS Manoharan and S.Illanchezian, 2008. Antibacterial, antifungal and tumor cell supression potential of *Morinda citrifolia* fruit extract. *International journal of Integrative Biology*. 3(1);44-49.
- Karlsson MR, J.Rugtveit and P.Brandtzaeg, 2004. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy *J Exp Med*. 199;1679-1688.
- Kamiya K, Y Tanaka, H Endang, M Umar and T Satake, 2004. Chemical Constituents of *Morinda citrifolia* fruits Inhibit Copper-Induced Low-Density Lipoprotein Oxidation. *J. Agric. Food. Chem.* 52;5843-5848.
- Kamiya K, Y Tanaka, H Endang, M Umar dan T Satake, 2005. New Anthraquinone and Iridoid from the Fruits of *Morinda citrifolia* L. *Chem. Pharm. Bull.* 53(12);1597-1599.
- Kang SY, SH Sung, JH Park dan YC Kim, 1998. Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyratum*. *Archives of Pharmacal Research*. 21(6);718-722.
- Kang TH, HO Pae, SJ Jeong, JC Yoo, BM Choi, CD Jun, et al., 1999. Scopoletin: an Inducible Nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*. *Planta Medica*. 65(5);400-403.
- Katzung BG, 2004. *Basic and Clinical Pharmacology*, 5th Ed, Prentice Hall International Inc, New York.
- Kearley J, JE Barker, DS Robinson and CM Lloyd, 2005. Resolution of Airway Inflammation and Hyperreactivity After in Vivo Transfer of CD4+CD25+ Regulatory T Cells is Interleukin 10 Dependent, *J Exp Med*, 202;1539-1547.
- Kim HJ, SI Jang, YJ Kim, HT Chung, YG Yun, HY Kang, et al., 2004. Scopoletin Suppresses Pro-inflammatory Cytokines and PGE₂ from LPS-Stimulated Cell Line, RAW 264.7 Cells. *Fitoterapia*. 75;(3-4),261-266.

- Kim NY, HO Pae, YS Ko, JC Yoo, BM Choi, et al., 1999. In Vitro Inducible Nitric Oxide Synthesis Inhibitory Active Constituents from *Fraxinus rhynchophylla*. *Planta Medica*. 65(7);656-658.
- Kikuchi K, T Takai, M Ota, T Kato, K Takeda, K Mitsuishi, et al., 2006. Application of Immunoreaction Enhancer Solutions to an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antigen-Specific IgE in Mice Immunized with Recombinant Major Mite Allergens or Ovalbumin, *Int Arch Allergy Immunol*. 141;322-330.
- Kindt TJ, RA Golgsby and BA Osborn, 2007. Kuby Immunology, WH Freeman and Company, New York, 362-379.
- Kostova I, 2005. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*. 5;29-46.
- Kresno SB, 2003. *Imunologi*, Edisi IV, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, 315-336.
- Lacy A and RO Kennedy, 2004. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer, *Current Pharmaceutical Design*. 10;3797-3811.
- Liu XL, JY Sun, HY Li, L Zhang and BC Qian, 2000. Extraction and Isolation of Active Component for Inhibiting PC3 Cell Proliferation in Vitro from the Fruit of *Lycium barbarum* L.. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi (China Journal of Chinese Materia Medica)*, 25(8);481-483.
- Liu X, L Zhang, X Fu, K Chen and B Qian, 2001. Effect of scopoletin on PC₃ Cell Proliferation and Apoptosis, *Acta pharmacol Scn*, 22(10);929-933.
- Maizels RM, 2005. Infections and Allergy Helminthes, Hygiene and Host Immune Regulation, *Curr Opin Immunol*. 17:656-661
- Maria GM, F Graciela, M Laura, L Paula and C Graciela, 2006. Comparative Immunomodulatory Effect of Scopoletin on Tumoral and Normal Lymphocytes, *Claudia LifeSciences (Life Sci.)*, 79(21);2043-2048.
- McClatchey W, 2002. From polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Integrative Cancer Therapies*. 1(2);110-120.

- Moon PD, BH Lee, HJ Jeong, HJ An, SJ Park and HR Kim, 2007. Use of Scopoletin to Inhibit the Production of Inflammatory Cytokines Through Inhibition of the I κ B/NF-K β Signal Cascade in the Human Mast Cell Line HMC-1, *European Journal of Pharmacology*. 555(2);218-225.
- Muralidharan P and J Srikanth, 2009. Antiulcer activity of *Morinda cirifolia* Linn. fruit extract. *J. Sci. Res*, 1(2);345-352.
- Murray RD, HJ Mendez and SA Brown, 1982. The Natural Cumarins, John Wiley and Sons Ltd, Bristol.
- Muschietti L, F Gorzalczany, G Ferraro, C Acevedo and V Martino, 2001, *Planta Medica*. 67(8);743-744.
- Noerdin D, 1986. Elusidasi Struktur Senyawa Organik dengan Cara Spektroskopi Ultralembayung dan Inframerah, Penerbit Angaksa, Bandung.
- O'Neil ED, 2006. The Merck Index, Thirteenth Edition, The Universal Copyright Convention, USA, 1221,1508.
- Ortan A, ML Popescu, AL Gaita, CN Pirvu and GH Campeanu, 2009. Contribution to the Pharmacognostical Study on *Anethum graveolens*, Dill (Apiaceae). *Romanian Biotechnological Letters*, 14(2);4342-4348.
- Parslow TG, DP Stites, AI. Terr and JB Imboden, 2001. Medical Immunology, Tenth edition, Mc Graw-Hill, New York, 167-174.
- Pawlus AD, BN Su, WJ Keller, DA Kinghorn, 2005. An Anthraquinone Reductase-Inducing Activity and Other Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J. Nat. Prod.* 68;1720-1722.
- Pratiwi G, T Hertiani dan Mufrod, 2011. Optimasi Komposisi Sukrosa Dan Aspartam Sebagai Bahan Pemanis Pada Formula Tablet-Effervescent Ekstrak Etanolik Buah Mengkudu, *Majalah Obat Tradisional*, 16(2);43-50.
- Price KS and RG Hamilton, 2007. Anaphylactoid Reactions in Two Patients after Omalizumab Administration after Successful Long-term Therapy, *Allergy Asthma Proc*, 28;313-319.
- Potterat O and M Hamburger, 2007. *Morinda citrifolia* L. (noni) Fruit Phytochemistry, Pharmacology, Safety, *Planta Med*, 73;191-199.

- Rautava S, M Kalliomaki and E Isolauri, 2005. New Therapeutic Strategy for Combating the Increasing Burden of Allergic Disease: Probiotics-A Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group report *J Allergy Clin Immunol.* 116;31–37.
- Robinson DS, M Larche and SR Urham, 2004. Tregs and Allergic Disease, *J Clin Invest.* 114;1389–1397
- Roitt IM, 1990. Pokok-pokok Ilmu Kekebalan, diterjemahkan oleh Bonang, G., E. Sulistijowati dan K. Tamzil, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Rollinger JM, A Hornick, T Langer, H Stuppner and H Pra, 2004. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopoletin Discovered by Virtual Screening of Natural Products, *J. Med. Chem.* 47 (25);6248-6254.
- Samoylenko V, J Zhao, DC Dunbar, IA Khan, JW Rushing and I Muhammad, 2006. New Constituents from Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* 54;6398-6402.
- Saludes, P Jonel, Garson, J Mary, G Franzblau, Scott, et al., 2005. Antitubercular Constituents from the Hexane Fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae) *Phytother Res.* 16(7);683-685.
- Schäfer M, 2008. Effects of *Morinda citrifolia* (noni) fruit pure on T cell activation, T cell proliferation and bactericidal activity in neonatal calves during the first two weeks of life. (Disertasi). Berlin: Universitas Berlin.
- Shaw CY, CH Chen, CC Hsu, C Chen, and YC Tsai, 2003. Antioxidant Properties of Scopoletin Isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytotherapy Research.* 17(7);823-825.
- Sethiya NK, A Nahata and VK Dixit, 2008, Simultaneous Spectrofluorometric Determination of Scopoletin and Mangiferin in A Methanolic Extract of *Canscora decussate* Schult.. *Asian Journal of Traditional Medicine,* 3(6);224-229.
- Silva WPK, SA Deraniyagala, RL Wijesundera, EH Karunanayake, and U Priyanka, 2000, Isolation of Scopoletin from Leaves of *Havea brasiliensis* and The Effect of Scopoletin on Phatogens of *H. brasiliensis*. *Mycopathologia,* 153;199-202.

- Skelly A, 2006. Polynesian Noni Juice on Radar of Cardiologists, *Medical Post*. Toronto, 42(12);25-26.
- Steenis V, 1988. Flora; Untuk Sekolah di Indonesia, Diterjemahkan oleh Moeso Surjowinoto, Pradya Pramita, Jakarta. 398.
- Steering Committee, 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*, 351;1225-1232.
- Su BN, AD Pawlus, HA Jung, WJ Keller, JHL McLaughlin and AD Kinghorn, 2005. Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. *J. Nat. Prod.*, 68;592-595.
- Subowo, 2010. *Imunologi Klinik*, Edisi ke 2, Sagung Seto, Jakarta.
- Sudjarwo SG, 2004. Potensi Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai Hepatoprotektor pada Mencit Yang Diberi Parasetamol, *Jurnal Penelitian Medika Eksakta*. 5(2);182-190.
- Sukandar EY, 2011. *ISO Farmakoterapi*, PT ISFI Penerbit, Jakarta, 476-487.
- Shukla YN, A Srivastava and S Kumar, 1999. Phytotoxic and Antimicrobial constituents of *Argyrea speciosa* and *Oenothera biennis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 67(2);241-245.
- Sunanda P and K Anand, 2006. Evaluation of the antithyroid, antioxdative dab antihyperglycemia activity of scopoletin from *Aegle marmelos* leaves in hyperthyroid rats. *Phytotherapy Research*, 20(12);1103-1105.
- Staci D, Bilbo and RJ Nelson, 2001. Sex Steroid Hormones Enchance Immune Function in Male and Female Siberian Hamsters. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 280; 207-213.
- Tjay TH dan K Raharja, 2002. *Obat Obat Penting*, Edisi ke lima, PT Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Thompson EB, 1985. *Drug Bioscreening, Fundamental of Drug Evaluationonn Thechnique in Pharmacology*, Graceway Publishing Company, New York.

- Wang M, GL Anderson and D Nowicki, 2003,. Synergistic Effect of Tahitian Noni® Juice (TNJ) and Methylsulfonmethane (MSM) on Mammary Breast Cancer Prevention at the Initiation Stage of Chemical Carcinogenesis Induced by DMBA in Female Sprague-Dawley(SD) Rats , *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2(11);1354.
- Wang M, H Kikuzaki, Y Jin, N Nakatani, N Zhu, K Csiszar et al., 2000. Novel Glycosides from Noni (*Morinda citrifolia*). *J. Nat. Prod.* 63;1182-1183.
- Winarti C, 2005. Peluang Pengembangan Minuman Fungsional dari Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Jurnal Litbang Pertanian*, 24(4);149-155.
- Wohlleben G, 2007, Inflammation Versus Immunoregulation: What is The Key to The Development of an Affective Antiallergy Vaccine?, *Phatobiology*. 3;270-276.
- Virella G, 2007. Medical Immunology, Informa Healthcare USA Inc., New York. 286-308.
- Yamin G, E Trisnawati, L Yusnayani, WN Santoso, Indrati, W Santosos, dkk., 1999. Pedoman Praktek Laboratorium yang Benar, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Yanwirasti 2009, Pedoman Penulisan Disertasi, Program S3 Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.
- Young PR, 2000. Practical Spectroscopy: The Rapid Interpretation of Spectral Data. Chicago: University of Illinois.
- Yun BS, IK Lee, IJ Ryoo and ID Yoo, 2001. Coumarins with Monoamine Oxidase Inhibitory Activity and Antioxidative Coumarino-Lignans from *Hibiscus syriacus*. *Journal of Natural Product*, 64(9);1238-1240.
- Zin ZM, A Hamid dan A Osman, 2002. Antioxidative Activity of Extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Root, Fruit and Leaf, *Journal of Food Chemistry*, 78(2);227-231.

Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik.



KOMITE ETIKA PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS
 Jl. Perintis Kemerdekaan Padang 25127
 Telepon: 0751 31746 Fax : 0751 32838 No. Reg : 036/KNEP/2008
 e-mail: fk2unand@pdg.vision.net.id

No: 106/KEP/FK/2011

UNIVERSITAS ANDALAS
KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL CLEARANCE

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azasi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul:

The Committee of the Research Ethics of the Faculty of Medicine, Andalas University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical/health research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

Pengaruh Skopeletin dari buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap interleukin-4, interleukin-10 dan imunoglobulin-E pada mencit putih jantan hipersensitivitas tipe I

Nama Peneliti Utama : Yufri Aldi
Name of the Investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Name of Institution

dan telah menyetujui protokol penelitian tersebut diatas.
and recommended the above research protocol

Padang, 21 Nopember 2011

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Faculty of Medicine, Andalas University

Ketua
Chairperson

Dr. dr. Masrul, MSc, Sp.GK
 NIP. 1956 1226 1987 101 001



Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K)
 NIP. 1953 1109 1982 112 001

Lampiran 2. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Kebun Tanaman Obat Universitas Andalas.



UNIVERSITAS ANDALAS PADANG
KEBUN TUMBUHAN OBAT

Kampus Unand Limau Manis Padang

SURAT KETERANGAN

No 21/KTO/20011

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan bahwa :

Nama : Drs. Yufri Aldi, M.Si. Apt.
Pekerjaan : Mahasiswa S-3 Biomedik Pascasarjana Universitas Andalas
No. BP : 07301002
Judul Disertasi : PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH MENKUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP INTERLEUKIN-4, INTERLEUKIN-10 DAN IMUNOGLOBULIN E PADA MENCIT PUTIH JANTAN HIPERSENSITIVITAS TIPE I

Telah melakukan pembuatan serbuk simplisia buah mengkudu dan mengisolasi senyawa skopoletin dari simplisia tersebut sampai murni serta karakterisasinya. Proses pembuatan serbuk simplisia dan isolasi senyawa skopoletin serta karakterisasinya dilaksanakan pada bulan Maret sampai bulan Mei 2011.

Demikianlah surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Padang, 16 Juni 2011

Kebun Tumbuhan Obat



Prof. DR. Amri Bakhtiar, MS, DSS. Apt.
NIP. 194904061979031 003

Lampiran 3. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Laboratorium Sentral Fakultas Farmasi Universitas Andalas.



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS ANDALAS PADANG
LABORATORIUM SENTRAL
 Kampus Limau Manis Padang

SURAT KETERANGAN

No : 058/Lab.Sentral/20011

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan bahwa :

Nama : Drs. Yufri Aldi, M.Si. Apt.
 Pekerjaan : Mahasiswa S-3 Biomedik Pascasarjana Universitas Andalas
 No. BP : 07301002
 Judul Disertasi : PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH MENKUDU
 (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP INTERLEUKIN-4,
 INTERLEUKIN-10 DAN IMUNOGLOBULIN E PADA MENCIT
 PUTIH JANTAN HIPERSENSITIVITAS TIPE I

Telah melakukan pengukuran karakterisasi senyawa skopoletin yang diisolasi dari buah mengkudu berupa pembuatan spektrum UV, IR dan HPLC. Proses karakterisasi senyawa skopoletin dilaksanakan pada tanggal 2 Mei sampai tanggal 25 Juli 2011.

Demikianlah surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya Atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Padang, 28 Juli 2011

Lab. Sentral Fakultas Farmasi



Drs. Harizul Rivai, MS.

NIP. 19530904 198702 1 001

Lampiran 4. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas.



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS ANDALAS
LABORATORIUM FARMAKOLOGI
 Kampus Limau Manis Padang

SURAT KETERANGAN

No : 067/Lab.Far/20011

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan bahwa :

Nama : Drs. Yufri Aldi, M.Si. Apt.
 Pekerjaan : Mahasiswa S-3 Biomedik Pascasarjana Universitas Andalas
 No. BP : 07301002
 Judul Disertasi : PENGARUH SKOPOLETIN DARI BUAH MENGGUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP INTERLEUKIN-4, INTERLEUKIN-10 DAN IMUNOGLOBULIN E PADA MENCIT PUTIH JANTAN HIPERSENSITIVITAS TIPE I.

Telah melakukan pemeliharaan, persiapan dan perlakuan hewan percobaan Mencit Putih Jantan (*Mus musculus* galur Swiss Webster) hingga hewan tersebut memenuhi kriteria yang sesuai dengan metode penelitian di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Proses pemeliharaan, persiapan dan perlakuan hewan coba dilakukan bulan Juni sampai bulan September 2011.

Demikianlah surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya. Atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Padang, 16 Desember 2011

Lab. Farmakologi Fakultas Farmasi



Drs. Surya Dharma, MS, Apt.

19840204 198702 1 001

Lampiran 5. Surat Keterangan Melaksanakan Penelitian dari Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

**Biomedical Laboratory
University of Andalas**

Medical Faculty
Jl. Perintis Kemerdekaan, PO.Box 49, Padang 25127
West Sumatera - Indonesia
Phone : +62 751 31746 Fax : +62 751 39844
e-mail : fkunand@pdg.vision.net.id



**Laboratorium Biomedik
Universitas Andalas
Fakultas Kedokteran**

Jl. Perintis Kemerdekaan, PO.Box 49, Padang 25127
Sumatera Barat - Indonesia
Phone : +62 751 31746 Fax : +62 751 39844
e-mail : fkunand@nda.vision.net.id

SURAT KETERANGAN

No: 024/H16.2/Lab.Biomedik/2011

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Prof.Dr.dr.Hj. Yanwirasti, PA
Jabatan : Ketua Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas Padang

Menerangkan bahwa :

Nama : Yufri Aldi
Pekerjaan : Biomedik - Pasca Sarjana (S3) FK Unand.
NIM : 07301002

Telah melakukan penelitian dengan judul "Aktivitas Senyawa Skopoletin dan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn) terhadap kadar Immunoglobulin E (IgE), Interleukin-4 (IL-4) dan Interleukin-10 (IL-10) pada mencit putih Hipersensitif Tipe I" dengan menggunakan metoda ELISA sesuai dengan sampel yang telah kami terima dan telah menyelesaikan semua administrasi terkait di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Demikian surat keterangan ini saya buat dan dapat digunakan sebagaimana mestinya.

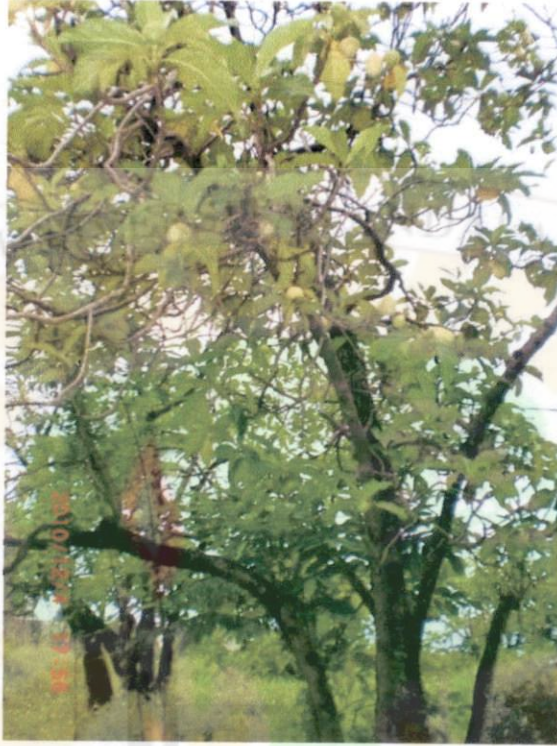
Padang, 02 Desember 2011
Ketua Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Unand



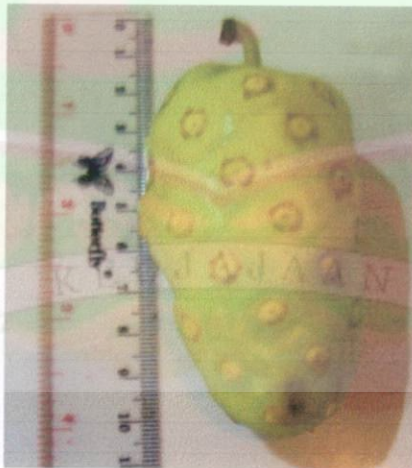
LABORATORIUM BIOMEDIK
Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas Padang

(Prof.Dr.dr.Hj. Yanwirasti,P.A.)
NIP. 194309301973032001

Lampiran 6. Gambar Tumbuhan dan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)



Gambar 6. Tumbuhan (*Morinda citrifolia* L.)



Gambar 7. Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Lampiran 7. Surat Hasil Identifikasi Tanaman Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) dari Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Padang.



HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. *811 e-mail: nas_herb@yahoo.com

Nomor : 068/K-ID/ANDA/XII/2011
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada Yth,
Yufri Aldi
Di
Padang

Dengan hormat,
Sehubungan dengan permohonan anda mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang anda bawa, atas nama:

Nama : Yufri Aldi
NIM : 07 301 002
Instansi : Pasca Sarjana UNAND

Berikut ini diberikan hasil identifikasi specimen yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

No	Family	Spesies
1	Rubiaceae	<i>Morinda citrifolia</i> L.

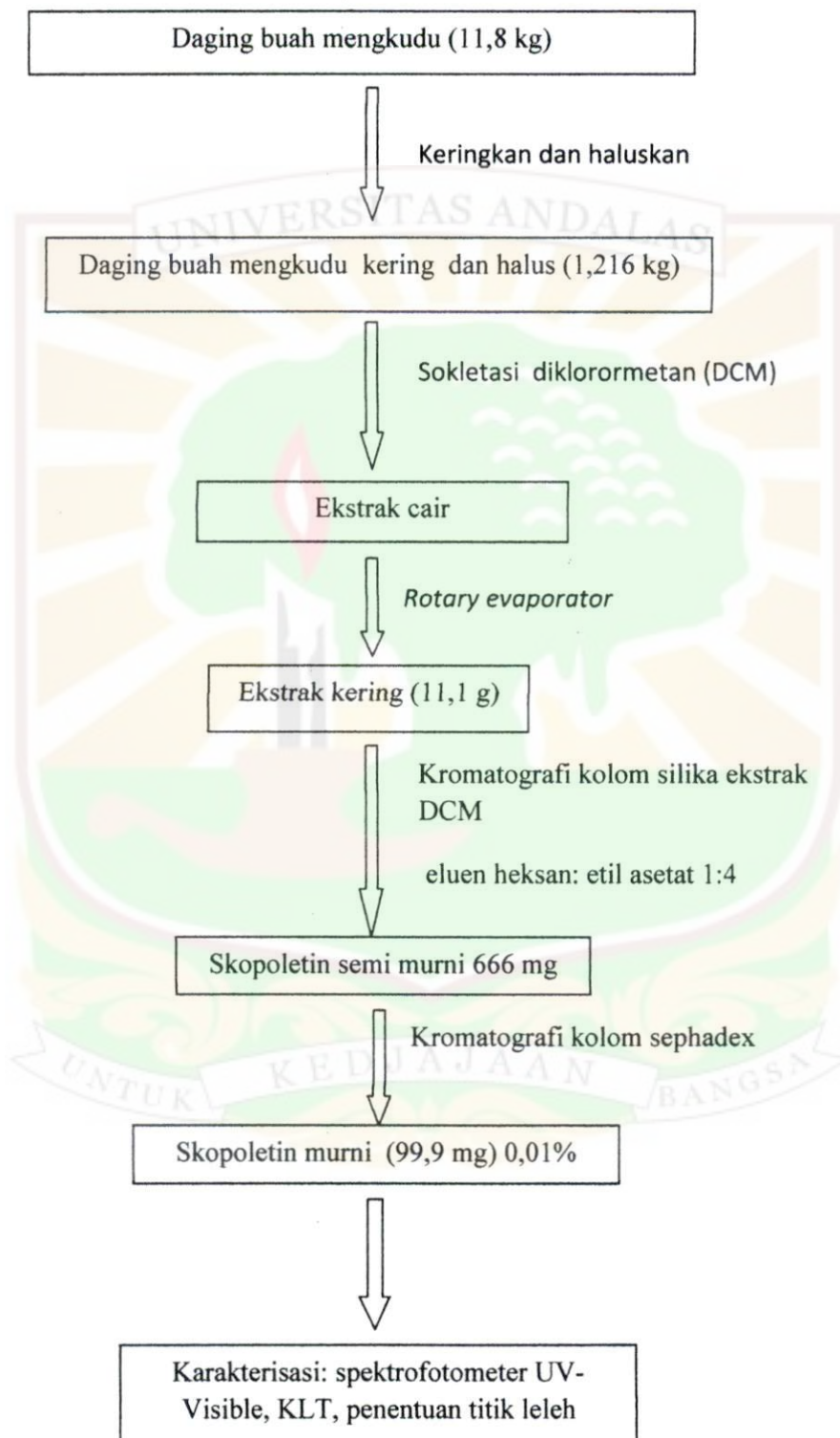
Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 1 Desember 2011
a.n. Kepala,



Nas, M.Si.
194908141995122001

Lampiran 8. Skema Isolasi Senyawa Skopoletin dari Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)



Lampiran 9. Hasil Pemeriksaan Susut Pengeringan dari Serbuk Kering Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.).

Ullangan	Berat krus kosong (mg)	Berat krus +serbuk (mg)	Berat serbuk (mg)	Setelah pengeringan 1	Setelah pengeringan 2	Setelah pengeringan 3
Sampel 1	19803,1	20805,7	1002,6	20696,8	20691,6	20689,2
Sampel 2	23000,2	24001,7	1001,5	23899,8	23894,1	23891,6
Sampel3	19703,4	20703,9	1000,5	20597,9	20592,6	20591,5

Setelah pengeringan ke-2, berat telah konstan (penurunan berat <50 mg). jadi data yang diambil adalah setelah pengeringan ke-2. Susut pengeringan dihitung dengan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{W1 - W2}{\text{Berat serbuk}} \times 100$$

Keterangan: W1= berat krus +serbuk

W2= berat krus+ serbuk setelah pengeringan (kedua)

$$\text{Susut pengeringan sampel 1} = \frac{20805,7 \text{ mg} - 20691,6 \text{ mg}}{1002,6 \text{ mg}} \times 100\% = 11,38\%$$

$$\text{Susut pengeringan sampel 2} = \frac{24001,7 \text{ mg} - 23894,1 \text{ mg}}{1001,5 \text{ mg}} \times 100\% = 10,74\%$$

$$\text{Susut pengeringan sampel 3} = \frac{20703,9 \text{ mg} - 20592,6 \text{ mg}}{1000,5 \text{ mg}} \times 100\% = 11,12\%$$

Susut pengeringan rata-rata = 11,08%

Lampiran 10. Hasil Pemeriksaan Kadar Abu dari Serbuk Kering Buah Mengkudu
(*Morinda citrifolia* L.)

Nomor	Berta Krus Kosong (Wo) (mg)	Berta Krus Kosong + Sampel (mg) (W1)	Berta Krus Kosong + Sampel (mg) <i>furnace</i> (W2)	Kadar Abu	Rata rata Kadar Abu
1	19815,5	21816,2	19929,1	5,678%	
2	35006,5	37007,4	35108,5	5,097%	5,798%
3	36136,4	38137,1	36268,8	6,618%	




Lampiran 11. Hasil Pemeriksaan Ukuran Partikel dari Serbuk Kering Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Nomor ayakan	Ukuran lubang	Berat ayakan (g)	Berat ayakan +serbuk (g)	Berat serbuk (g)	%R	%R kumulatif
10	2 mm	405,4	407,5	2,1	2,1 %	2,1 %
18	1 mm	387,4	414,5	27,1	27,1 %	29,2 %
30	600 μ m	342,5	378,9	36,4	36,4 %	65,6 %
45	355 μ m	315,4	334,4	19,0	19,0 %	84,6 %
60	250 μ m	312,2	321,3	9,1	9,1 %	93,7 %
70	212 μ m	298,5	299,0	2,0	2,0 %	95,7 %
100	150 μ m	295,7	297,8	2,1	2,1 %	97,8 %
120	125 μ m	297,4	298,8	1,4	1,4 %	99,2 %
Penampung	0	267,4	268,2	0,8	0,8 %	100 %

Dari distribusi ukuran partikel ini diketahui bahwa serbuk daging buah mengkudu ini tergolong serbuk sangat kasar. Serbuk sangat kasar adalah bahwa semua serbuk dapat melewati ayakan nomor 8 dan tidak lebih dari 20% yang dapat melewati ayakan nomor 60 (Farmakope Indonesia edisi IV).

Lampiran 12. Sertifikat Analisis Skopoletin dari Extrasintase Perancis

SPECIFICATION**Scopoletin****REF 0528**

Chemical family	Coumarins				
Synonym	7-Hydroxy-6-methoxycoumarin ; 6-Methoxyumbelliferone				
CAS Number	[82-61-5]				
Empirical formula	C ₁₀ H ₈ O ₄				
Molecular weight	182,17				
Classification	 Skin Corrosion/Irritation (Category 2) (H315) ; Serious Eye Damage/Eye Irritation (Category 2) (H318) ; Specific Target Organ Toxicity - Single Exposure (Category 3) (H335)				
Storage	Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place, away from light.				
<hr/>					
Appearance	Beige-coloured Powder				
U.V / Visible spectrum	<table border="0"> <tr> <td>λ_{max}</td> <td>228, 252, 260sh, 297, 345 nm</td> </tr> <tr> <td>($\pm 2nm$)</td> <td>in methanol</td> </tr> </table>	λ_{max}	228, 252, 260sh, 297, 345 nm	($\pm 2nm$)	in methanol
λ_{max}	228, 252, 260sh, 297, 345 nm				
($\pm 2nm$)	in methanol				
Melting point	203-208°C				
Assay (HPLC)	$\geq 95\%$				

Creation date : April 2009 (version 1)

Impasse Jacquard - B.P. 62-Z.I Lyon Nord-69730 GENAY - FRANCE - Tel : (33)0478-96-20-34 - Fax : (33)0478-96-19-45 - www.extrasynthese.com

07/03/2008

MATERIEL SAFETY DATA SHEET

Edition 2 Revision date 03/03/2008 Creation date 11/05/2007

1. IDENTIFICATION SUBSTANCE / PREPARATION AND COMPANY

Product name : Scopoletin
 Catalogue numbe : 0528
 Supplier :

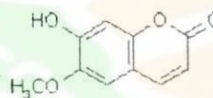
EXTRASYNTHÈSE
 Impasse Jacquard - B.P. 62
 Z.I Lyon Nord
 69730 GENAY - FRANCE
 (33)(0)478-98-20-34
 (33)(0)478-98-19-45

2. HAZARDS IDENTIFICATION

Potential health effects : Irritating to eyes, respiratory system and skin.
 Physical and chemical hazards : No data.
 Environmental hazards : No data.

3. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Ingredient name : Scopoletin
 Empirical formula : $C_{10}H_8O_4$
 CAS NUMBER : [92-61-5]
 Synonyms : 7-Hydroxy-6-methoxycoumarin ;
 6-Methoxyumbelliferone

**4. FIRST AID MEASURES**

Inhalation : Remove to fresh air. If symptoms persist, seek medical advice.
 After skin contact : Immediately wash skin with water and soap.
 Eye contact : Immediately irrigate the eyes with water. If irritation persist, seek medical advice.
 Ingestion : Wash out mouth with copious amounts of water. Do not induce vomiting, seek medical advice.

5. FIRE FIGHTING MEASURES

Fire fighting measures : Carbon dioxide extinguishers, dry powder.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Personal precautions : Wear approved mask, gloves, protective clothing and eye protection.
 Methods for cleaning up : Put and keep in a tightly closed container for disposal. Wash thoroughly with water and soap.

7. HANDLING AND STORAGE

Handling : See section 8.
 Storage : Store in a tightly closed container in a dry place and away from light.

8. EXPOSURE CONTROL/PERSONAL PROTECTION

Respiratory protection : Wear approved mask / respirator imperatively.
 Hand protection : Wear suitable gloves / gauntlets.
 Eye protection : Wear suitable eye protection.
 Skin protection : Wear suitable protective clothing.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Solubility in : Soluble
 Ethyl alcohol : Soluble
 Physical state : Powder

10. STABILITY AND REACTIVITY

Information : No data.

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

RTECS : GN 6930000

Carcinogenicity : No Data

Irritation : No Data

Mutagenicity : No Data

Reprotoxicity : No Data

Toxicologic data :

p.o. Rat : LD50: 3800 mg/kg

Tumorigenic data : No Data

Information Disposal consideration No Data EEC label Risk Safety	12. ECOLOGICAL INFORMATION : Chemical natural biodegradable. 13. DISPOSAL CONSIDERATIONS : No data. 14. TRANSPORT INFORMATION 15. REGULATORY INFORMATION 16. OTHER INFORMATION : 202-171-9 : Reagent for research use only. While the information here in is believed to be reliable, it is furnished without warranty of any kind. It shall be used only as a guide. We assume no liabilities from the use of this product or information mentioned here in.
---	---

EINECS

Use



Lampiran 13. Perhitungan Linearitas Daerah Area di Bawah Kurva HPLC dari Senyawa Skopoletin.

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1.000	1.000	1.000	692653.262

The independent variable is konsentrasi.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	8.446E15	1	8.446E15	17603.931	.000
Residual	1.439E12	3	4.798E11		
Total	8.447E15	4			

The independent variable is konsentrasi.

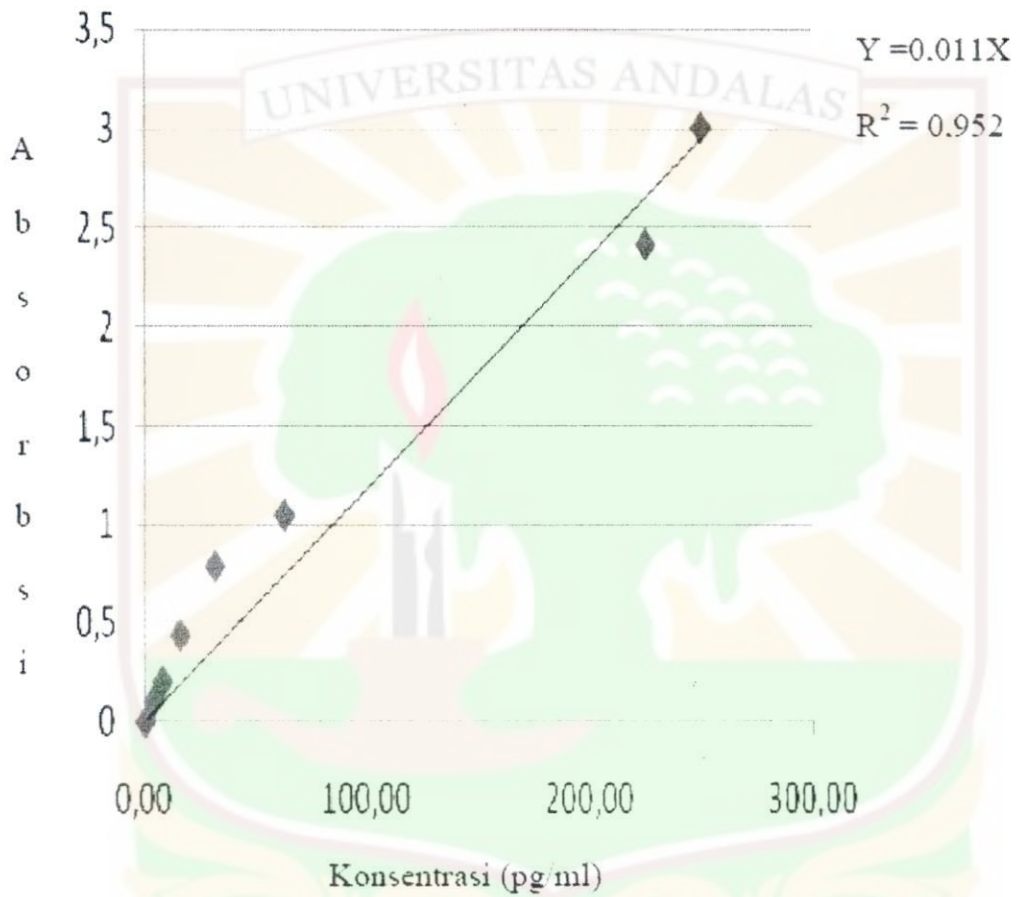
Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
konsentrasi	2511296.498	18927.496	1.000	132.680	.000
(Constant)	675227.333	468928.475		1.440	.246

Lampiran 14. Nilai Absorban dari IL-4 Standar pada Panjang Gelombang 450 nm.

Nomor	Konsentrasi (ng/ml)	Absorban
1	0	0.00
2	3.9063	0,108
3	7.8125	0,205
4	15.625	0,437
5	31.25	0,790
6	62.5	1,455
7	125	2,512
8	250	3,112

Lampiran 15. Kurva Standar IL-4 pada Panjang Gelombang 450 nm.



Gambar 8. Kurva standar IL-4 pada panjang gelombang 450 nm.

Lampiran 16. Nilai Absorban dari IL-4 dalam Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu pada Panjang Gelombang 450 nm.

No.	Kelompok Perlakuan	Nilai Absorban				
		1	2	3	4	5
1	I	0,260	0,191	0,156	0,194	0,157
2	II	0,768	0,859	0,679	0,808	0,605
3	III	0,467	0,478	0,474	0,422	0,493
4	IV	0,455	0,353	0,460	0,356	0,279
5	V	0,254	0,290	0,343	0,266	0,349

Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

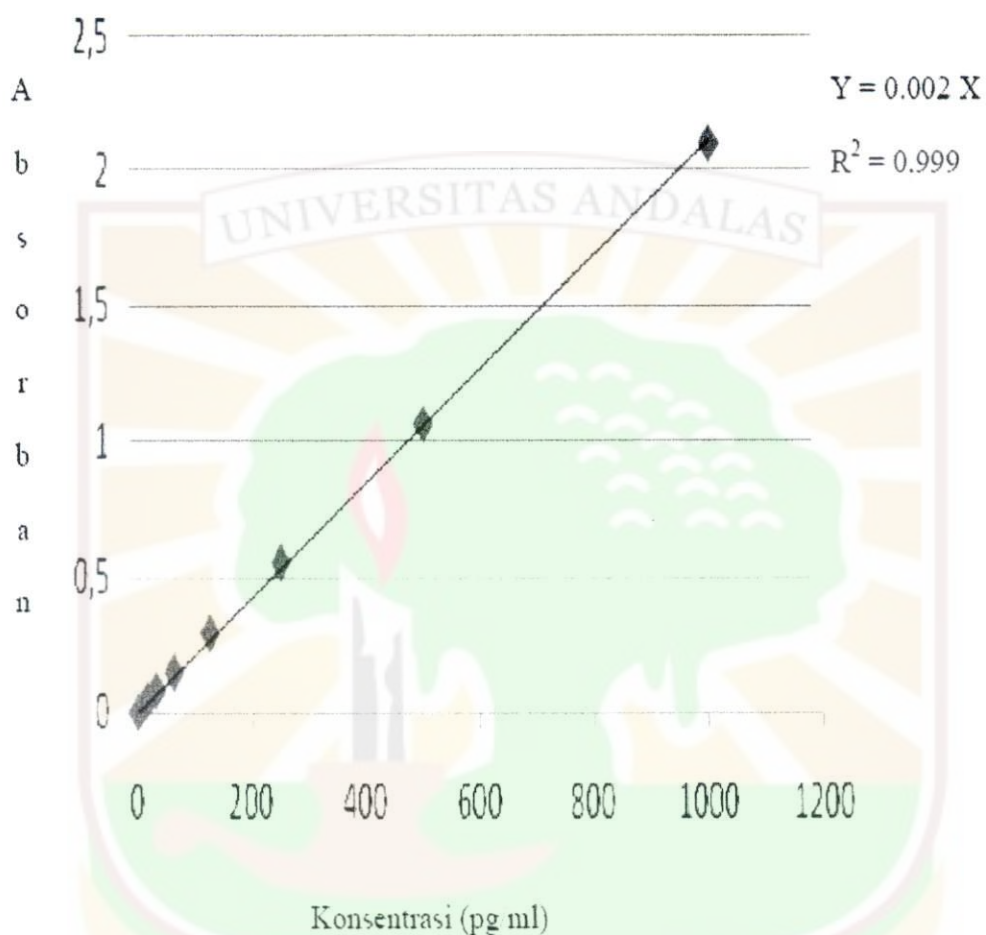
V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

VI. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.

Lampiran 17. Nilai Absorban dari IL-10 Standar pada Panjang Gelombang 450 nm.

Nomor	Konsentrasi (ng/ml)	Absorban
1	0	0.00
2	15.625	0,103
3	31.25	0,152
4	62.5	0,225
5	125	0,307
6	250	0,582
7	500	1,063
8	1000	2,006

Lampiran 18. Gambar Kurva Standar IL10 pada Panjang Gelombang 450 nm.



Gambar 9. Kurva standar IL-10 pada panjang gelombang 450 nm.

Lampiran 19. Nilai Absorban dari IL-10 dalam Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu pada Panjang Gelombang 450 nm.

No.	Kelompok Perlakuan	Nilai Absorban				
		1	2	3	4	5
1	I	0,229	0,228	0,189	0,232	0,275
2	II	0,364	0,381	0,427	0,413	0,427
3	III	0,338	0,279	0,332	0,346	0,306
4	IV	0,313	0,236	0,267	0,323	0,309
5	V	0,236	0,298	0,263	0,299	0,291

Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

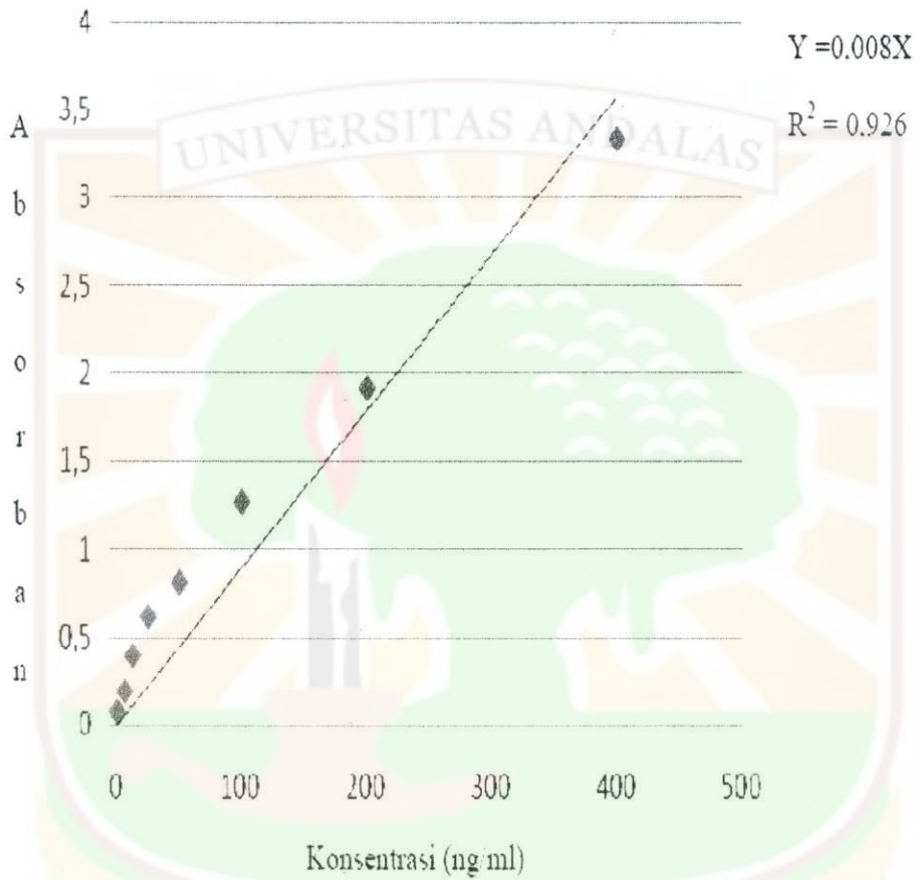
IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.

Lampiran 20. Nilai Absorban dari IgE Standar pada Panjang Gelombang 450 nm.

Konsentrasi (ng/ml)	Absorban
0	0.00
6.25	0.197
12.5	0.398
25	0.619
50	0.812
100	1.269
200	1.917
400	3.33

Lampiran 21. Gambar Kurva Standar IgE pada Panjang Gelombang 450 nm.



Gambar 10. Kurva standar IgE pada panjang gelombang 450 nm.

Lampiran 22. Nilai Absorban dari IgE Serum Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Skopoletin dari Buah Mengkudu pada Panjang Gelombang 450 Nm

No.	Kelompok Perlakuan	Nilai Absorban				
		1	2	3	4	5
1	I	0,317	0,316	0,348	0,320	0,349
2	II	1,314	1,732	1,729	1,447	1,307
3	III	0,957	0,953	0,848	0,569	0,802
4	IV	0,519	0,733	0,566	0,517	0,774
5	V	0,433	0,505	0,504	0,557	0,611

Keterangan : I. Hewan normal.

II. Hewan kontrol positif (larutan NaCMC).

III. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 1 mg/kg bb.

IV. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 3 mg/kg bb.

V. Hewan hipersensitivitas tipe I dosis 10 mg/kg bb.

Lampiran 23. Hasil Uji Statistik Analisa Varian Satu Arah dari Kadar IL-4, IL-10 dan IgE Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Senyawa Skolpoletin

Deskriptif

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
IgE (ng/ml)	I	5	4.1250	21.19478	9.47859	386.1832	438.8168	395.00	436.25
	II	5	1.8822	265.71748	1.18832	1552.3182	2212.1818	1633.75	2165.00
	III	5	1.0322	198.03606	88.56442	786.3558	1278.1442	711.25	1196.25
	IV	5	7.7725	153.34143	68.57637	586.8515	967.6485	646.25	967.50
	V	5	6.5250	83.10385	37.16517	549.3129	755.6871	541.25	763.75
	Total	25	9.5135	539.22312	1.07845	728.7696	1173.9304	395.00	2165.00
IL4 (pg/ml)	I	5	34.8360	7.68532	3.43698	25.2934	44.3786	28.36	47.27
	II	5	1.3524	18.50739	8.27676	112.2560	158.2160	110.00	156.18
	III	5	84.8740	4.87062	2.17821	78.8263	90.9217	76.73	89.64
	IV	5	69.2020	13.94540	6.23657	51.8865	86.5175	50.73	83.64
	V	5	54.6160	7.93520	3.54873	44.7631	64.4689	46.18	63.45
	Total	25	75.7528	36.31893	7.26379	60.7611	90.7445	28.36	156.18
IL10 (pg/ml)	I	5	2.2820	30.80097	13.77461	189.9555	266.4445	189.00	275.00
	II	5	4.0240	28.52718	12.75774	366.9788	437.8212	364.00	427.00
	III	5	3.2660	33.89395	15.15784	284.5151	368.6849	279.00	364.00
	IV	5	2.8960	36.82119	16.46694	243.8805	335.3195	236.00	323.00
	V	5	2.8640	55.85517	24.97919	217.0466	355.7534	232.00	379.00
	Total	25	3.0664	68.20733	13.64147	278.4854	334.7946	189.00	427.00

Lampiran 23. (Lanjutan)

Anova

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IgE (ng/ml)	Between Groups	6415505.375	4	1603876.344	56.999	.000
	Within Groups	562772.500	20	28138.625		
	Total	6978277.875	24			
IL4 (pg/ml)	Between Groups	28926.546	4	7231.636	52.959	.000
	Within Groups	2731.009	20	136.550		
	Total	31657.555	24			
IL10 (pg/ml)	Between Groups	82106.160	4	20526.540	13.894	.000
	Within Groups	29547.600	20	1477.380		
	Total	111653.760	24			

Lampiran 24. Hasil Uji Lanjut Bonferroni dari Kadar IL-4, IL-10 dan IgE Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I Setelah Pemberian Senyawa Skolpoletin.

Dependent Variable	(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
IgE (ng/ml)	I	II	-1469.75000*	1.06092E2	.000	-1804.2996	-1135.2004	
		III	-619.75000*	1.06092E2	.000	-954.2996	-285.2004	
		IV	-364.75000*	1.06092E2	.026	-699.2996	-30.2004	
		V	-240.00000	1.06092E2	.350	-574.5496	94.5496	
		II	I	1469.75000*	1.06092E2	.000	1135.2004	1804.2996
	II	III	850.00000*	1.06092E2	.000	515.4504	1184.5496	
		IV	1105.00000*	1.06092E2	.000	770.4504	1439.5496	
		V	1229.75000*	1.06092E2	.000	895.2004	1564.2996	
		III	I	619.75000*	1.06092E2	.000	285.2004	954.2996
		II	-850.00000*	1.06092E2	.000	-1184.5496	-515.4504	
	III	IV	255.00000	1.06092E2	.261	-79.5496	589.5496	
		V	379.75000*	1.06092E2	.019	45.2004	714.2996	
		IV	I	364.75000*	1.06092E2	.026	30.2004	699.2996
		II	-1105.00000*	1.06092E2	.000	-1439.5496	-770.4504	
		III	-255.00000	1.06092E2	.261	-589.5496	79.5496	
	IV	V	124.75000	1.06092E2	1.000	-209.7996	459.2996	
		V	I	240.00000	1.06092E2	.350	-94.5496	574.5496
		II	-1229.75000*	1.06092E2	.000	-1564.2996	-895.2004	
		III	-379.75000*	1.06092E2	.019	-714.2996	-45.2004	
		IV	-124.75000	1.06092E2	1.000	-459.2996	209.7996	
IL4 (pg/ml)	I	II	-100.40000*	7.39055	.000	-123.7054	-77.0946	
		III	-50.03800*	7.39055	.000	-73.3434	-26.7326	

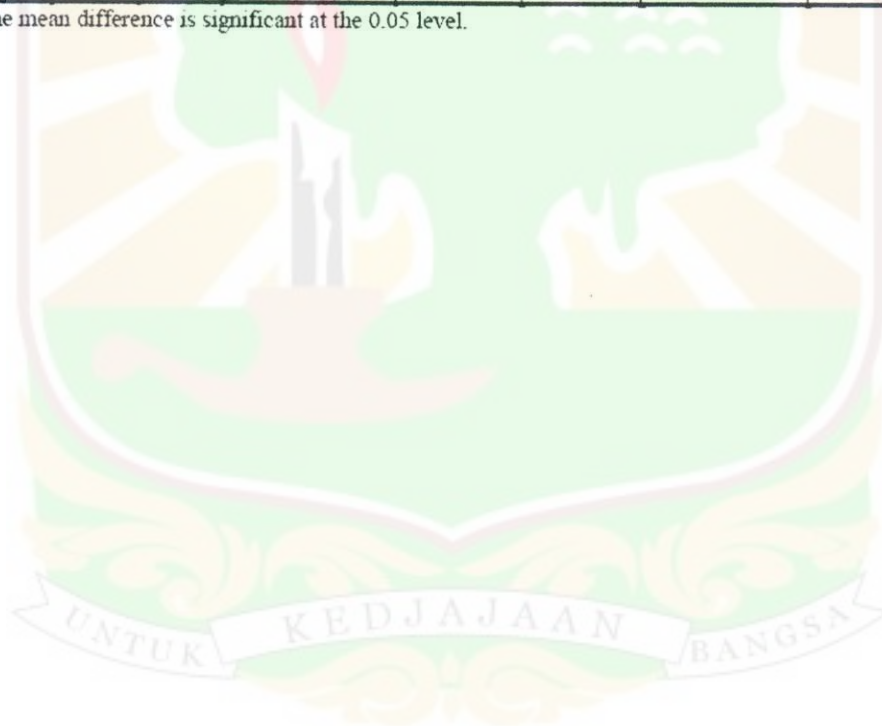
Lampiran 24. (Lanjutan)

	IV		-34.36600*	7.39055	.002	-57.6714	-11.0606
	V		-19.78000	7.39055	.145	-43.0854	3.5254
II	I		100.40000*	7.39055	.000	77.0946	123.7054
	III		50.36200*	7.39055	.000	27.0566	73.6674
	IV		66.03400*	7.39055	.000	42.7286	89.3394
	V		80.62000*	7.39055	.000	57.3146	103.9254
III	I		50.03800*	7.39055	.000	26.7326	73.3434
	II		-50.36200*	7.39055	.000	-73.6674	-27.0566
	IV		15.67200	7.39055	.467	-7.6334	38.9774
	V		30.25800*	7.39055	.006	6.9526	53.5634
IV	I		34.36600*	7.39055	.002	11.0606	57.6714
	II		-66.03400*	7.39055	.000	-89.3394	-42.7286
	III		-15.67200	7.39055	.467	-38.9774	7.6334
	V		14.58600	7.39055	.624	-8.7194	37.8914
V	I		19.78000	7.39055	.145	-3.5254	43.0854
	II		-80.62000*	7.39055	.000	-103.9254	-57.3146
	III		-30.25800*	7.39055	.006	-53.5634	-6.9526
	IV		-14.58600	7.39055	.624	-37.8914	8.7194
IL10 (pg/ml)	I	II	-174.20000*	24.30950	.000	-250.8576	-97.5424
		III	-98.40000*	24.30950	.006	-175.0576	-21.7424
		IV	-61.40000	24.30950	.201	-138.0576	15.2576
		V	-58.20000	24.30950	.266	-134.8576	18.4576
	II	I	174.20000*	24.30950	.000	97.5424	250.8576
		III	75.80000	24.30950	.054	-8576	152.4576
		IV	112.80000*	24.30950	.002	36.1424	189.4576
		V	116.00000*	24.30950	.001	39.3424	192.6576
	III	I	98.40000*	24.30950	.006	21.7424	175.0576
		II	-75.80000	24.30950	.054	-152.4576	.8576

Lampiran 24. (Lanjutan)

	IV	37.00000	24.30950	1.000	-39.6576	113.6576
	V	40.20000	24.30950	1.000	-36.4576	116.8576
IV	I	61.40000	24.30950	.201	-15.2576	138.0576
	II	-112.80000*	24.30950	.002	-189.4576	-36.1424
	III	-37.00000	24.30950	1.000	-113.6576	39.6576
	V	3.20000	24.30950	1.000	-73.4576	79.8576
	V	58.20000	24.30950	.266	-18.4576	134.8576
	II	-116.00000*	24.30950	.001	-192.6576	-39.3424
	III	-40.20000	24.30950	1.000	-116.8576	36.4576
	IV	-3.20000	24.30950	1.000	-79.8576	73.4576

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Lampiran 25. Gambar Alat Spektrofotometer Bio Rad.



Gambar 11. Alat spektrofotometer Bio Rad dan komputer pengolahan data.



Gambar 12. Alat spektrofotometer Bio Rad dan *microwell*

Lampiran 26. Gambar Mencit Putih Jantan Hipersensitivitas Tipe I.



Gambar 13. Mencit Putih Jantan yang Telah Mengalami Reaksi Hipersensitivitaws Tipe I.

