

417A
FAR

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

PENGEMBANGAN EKSTRAK DAUN WARU (*Hibiscus similis L*) dan PEGAGAN (*Centella asiatica L*) SEBAGAI FITOFARMAKA ANTITUBERKULOSIS

Tahap I : Uji aktivitas antimikobakterium, sistem imun
dan karakterisasi ekstrak

Yun Astuti Nugroho
Winarsih

PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN FARMASI &
OBAT TRADISIONAL
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
DEPARTEMEN KESEHATAN RI
2003

2011
2013

Bahan Penelitian dan Kegemilangan Kecerdasan	
PERPUSTAKAAN	
Tanggal	9-2-05
Pengaruh	417/2005
No. file	417 A
	FAR

RINGKASAN EKSEKUTIF

Pengembangan Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus similis L*) dan Kaki Kuda/Pegagan (*Centella asiatica L*) Sebagai Fitofarmaka Antituberkulosis.

Tahap I: " Uji aktivitas antimikobakterium, sistem imun, dan karakterisasi ekstrak " Yun Astuti Nugroho; dkk

Di Indonesia tuberculosis (TB) paru masih merupakan masalah utama kesehatan masyarakat. Menurut hasil SKRT penyakit TB paru menduduki peringkat ke tiga penyebab kematian setelah penyakit kardiovaskuler dan infeksi saluran pernafasan dan nomor satu dari golongan penyakit infeksi.

Pemerintah telah melaksanakan strategi DOTS (*Directly Observed Treatment, Shortcourse chemotherapy*) untuk pengobatan TB paru melalui Gerdunas yaitu program pengobatan gratis di Puskesmas. Tapi keberhasilan penyembuhan masih kecil (17%). Kegagalan pengobatan TB paru antara lain rendahnya kepatuhan penderita minum obat dan kombinasi obat yang tidak lengkap diduga menyebabkan kekebalan ganda kumar TB terhadap obat antituberkulosis atau *Multi Drug Resistance* (MDR). Permasalahan yang lain, penderita TB paru pada umumnya tingkat sosial ekonominya rendah, sehingga krisis ekonomi yang berkepanjangan menyebabkan status gizi menurun, kekebalan tubuh menurun yang berakibat semakin rentannya terinfeksi TB paru. Salah satu cara mengatasi resistensi dan meningkatkan daya tahan tubuh dapat dipertimbangkan penggunaan alternatif pengobatan, antara lain dengan tanaman obat.

Indonesia sebagai negara tropis mempunyai banyak tanaman obat yang secara empirik atau tradisional dipakai untuk mengobati penyakit TB paru. Tanaman itu antara lain, Waru (*Hibiscus similis L*), Kaki kuda/Pegagan (*Centella asiatica L*). Tanaman tersebut selain dipakai untuk TB paru juga sebagai antibakteri dan dapat memperbaiki sistem kekebalan tubuh. Berdasarkan uraian tersebut dilakukan penelitian "Pengembangan Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus similis L*) dan Kaki Kuda/Pegagan (*Centella asiatica L*) Sebagai Fitofarmaka Antituberkulosis dan pada tahap pertama telah selesai " Uji aktivitas antimikobakterium, sistem imun, dan karakterisasi ekstrak "

Tujuan penelitian :

1. Menentukan karakter dari ekstrak daun Waru dan Kaki Kuda/ Pegagan
2. Membandingkan antara kelompok yang diberi bahan uji (ekstrak total daun Waru dan herba Pegagan) dan kelompok kontrol dalam menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (MDR) dan H37RV secara in vitro.
3. Mengukur peningkatan konsentrasi Imunoglobulin G (IgG) mencit yang diinduksi SDMD (sel darah merah domba)1% + ekstrak daun Waru dengan tiga tingkatan dosis.
4. Mengukur peningkatan konsentrasi Imunoglobulin G (IgG) mencit yang diinduksi SDMD (sel darah merah domba)1% + ekstrak herba Pegagan dengan tiga tingkatan dosis.

Hasil penelitian, ekstraksi daun Waru menghasilkan rendemen sebesar 21% dan hasil karakterisasi non spesifik (%), kadar abu 6,16; kadar abu larut air 5,05; kadar abu tidak larut asam 0 dan kadar air 16,08. Karakterisasi spesifik (%), kadar sari larut air 47,10; kadar sari larut dalam etanol 14,82; kadar tanin 7,92. Golongan kimia yang diperoleh dari ekstrak daun Waru adalah alkaloid dan tanin. Ekstraksi herba Pegagan menghasilkan rendemen sebesar 8,4 % dan hasil karakterisasi non spesifik (%), kadar abu 9,71; kadar abu larut air 6,18; kadar abu tidak larut asam 0,55 dan kadar air 6,39. Karakterisasi spesifik (%), kadar sari larut air 34,50; kadar sari larut dalam etanol 10,44; kadar asiatikosida 1,00.

Golongan kimia yang diperoleh dari ekstrak herba Pegagan adalah saponin, steroid, triterpen, glikosida, alkaloid, tanin, flavonoid

Uji khasiat antibakteri, ekstrak daun Waru 36 mg/ml untuk bakteri *Mycobacterium tuberculosis* strain H37RV pada media L-J dan 7H10 agar menunjukkan adanya daya hambat tapi untuk *Mycobacterium tuberculosis* strain MDR tidak menunjukkan adanya hambatan. Ekstrak herba Pegagan 22,5 mg/ml untuk bakteri *Mycobacterium tuberculosis* strain H37RV pada media L-J dan 7H10 agar menunjukkan adanya daya hambat tapi untuk *Mycobacterium tuberculosis* strain MDR tidak menunjukkan adanya hambatan.

Uji imunomodulator, Uji imunomodulator, pemberian ekstrak daun Waru dosis 4; 12 dan 36 mg/20 g bb pada mencit yang diinduksi SDMD 1% dapat menaikkan kadar IgG sebesar 76,25; 169,25 dan 310,37 mg/dl. Ekstrak daun Waru dosis 36mg/20 g bb mempunyai potensi yang sama dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb dalam menaikkan kadar IgG. Pemberian ekstrak Pegagan dosis 2,5; 7,5 dan 22,5 mg/20 g bb dapat meningkatkan kadar IgG sebesar 82,00; 148,62 dan 361,25 mg/dl. Ekstrak herba Pegagan dosis 22,5 mg/20 g bb khasiatnya sebanding dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb dalam meningkatkan kadar IgG mencit yang diinduksi SDMD 1%.

Kesimpulan

1. Ekstrak daun Waru dan Herba Pegagan yang digunakan untuk penelitian mempunyai karakter yang jelas dan ekstrak Herba Pegagan sesuai dengan pedoman yang ditetapkan.
2. Ekstrak daun Waru (*Hibiscus similis* L) 36 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37VR
3. Ekstrak Kaki kuda/Pegagan (*Centella asiatica* L) 22,5 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* H37VR
4. Ekstrak Waru (*Hibiscus similis* L) dosis 36 mg/20 g bb dapat meningkatkan kadar Imunoglobulin G sebesar 310,375 mg/dl. sebanding dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb
5. Ekstrak Kaki kuda/Pegagan (*Centella asiatica* L) dosis 22,5 mg/dl dapat meningkatkan kadar Imunoglobulin G 361,25 mg/dl sebanding dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb

Saran, hasil penelitian dapat membantu program dalam hal ini Depkes bahwa ekstrak daun Waru dan herba Pegagan dapat dimanfaatkan sebagai komplemen obat tuberkulosis yang sudah ada.

ABSTRAK

Tanaman Waru (*(Hibiscus similis L)*, Kaki kuda atau Pegagan (*Centella asiatica L*). secara tradisional dipakai untuk pengobatan penyakit tuberkulosis, dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Oleh karena itu telah dilakukan "Uji aktivitas antimikobakterium, sistem imun dan karakterisasi ekstrak".

Metode penelitian, standarisasi menggunakan pedoman dari Badan POM (2000), uji khasiat antimikobakterium menggunakan metode konsentrasi absolut (2001) dan uji imunitas menggunakan metode RID (*Radial Immunodiffusion*, 1977).

Hasil penelitian, ekstraksi daun Waru menghasilkan rendemen sebesar 21% dan hasil karakterisasi non spesifik (%), kadar abu 6,16; kadar abu larut air 5,05; kadar abu tidak larut asam 0 dan kadar air 16,08. Karakterisasi spesifik (%), kadar sari larut air 47,10; kadar sari larut dalam etanol 14,82; kadar tanin 7,92. Golongan kimia yang diperoleh dari ekstrak daun Waru adalah alkaloid dan tanin. Ekstraksi herba Pegagan menghasilkan rendemen sebesar 8,4 % dan hasil karakterisasi non spesifik (%), kadar abu 9,71; kadar abu larut air 6,18; kadar abu tidak larut asam 0,55 dan kadar air 6,39. Karakterisasi spesifik (%), kadar sari larut air 34,50; kadar sari larut dalam etanol 10,44; kadar asiatisida 1,00. Golongan kimia yang diperoleh dari ekstrak herba Pegagan adalah saponin, steroid, triterpen, glikosida, alkaloid, tanin, flavonoid

Uji khasiat antibakteri, ekstrak daun Waru 36 mg/ml bakteri tuberkulosis strain *Mycobacterium tuberculosis* H37RV pada media L-J dan 7H10 agar menunjukkan adanya hambatan tapi untuk strain *Mycobacterium tuberculosis* MDR tidak ada hambatan. Ekstrak herba Pegagan 22,5 mg/ml untuk strain *Mycobacterium tuberculosis* H37RV pada media L-J dan 7H10 agar menunjukkan adanya hambatan tapi untuk strain *Mycobacterium tuberculosis* MDR tidak ada hambatan.

Uji imunomodulator, kenaikan kadar IgG setelah pemberian ekstrak daun Waru dosis 4; 12 dan 36 mg/20 g bb pada mencit yang diinduksi SDMD 1% adalah 76,25; 169,25 dan 310,37 mg/dl. Ekstrak daun Waru dosis 36mg/20 g bb mempunyai potensi yang sama dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb ($p=0,407$) dalam menaikkan kadar IgG. Pemberian ekstrak herba Pegagan dosis 2,5; 7,5 dan 22,5 mg/20 g bb dapat meningkatkan kadar IgG sebesar 82,00; 148,62 dan 361,25 mg/dl. Ekstrak herba Pegagan dosis 22,5 mg/20 g bb khasiatnya sebanding dengan Vitamin A dosis 400 UI/20 g bb ($p=0,684$) dalam meningkatkan kadar IgG mencit yang diinduksi SDMD 1%.

Kesimpulan, ekstrak daun Waru (*Hibiscus similis L*) dan herba Pegagan dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* strain H37VR. Ekstrak daun Waru (*Hibiscus similis L*) dosis 36 mg/20 g bb dapat meningkatkan kadar IgG sebesar 310,375 mg/dl. Ekstrak herba Kaki kuda/Pegagan (*Centella asiatica L*) dosis 22,5 mg/dl dapat meningkatkan kadar IgG sebesar 361,25 mg/dl

Kata kunci: Waru; *Hibiscus similis L*; Pegagan; *Centella asiatica L*; Tuberkulosis; Imunitas.

SUSUNAN TIM PENELITI

Berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan RI, Nomor: HK.00.06.2.1.726 susunan tim pelaksana penelitian sebagai berikut:

Ketua Pelaksana	: Dra. Yun Astuti Nugroho
Peneliti Utama	: Dra. Retno Gitawati, MSi
Peneliti	: Dra. Misnardiary, APU Drs. Pudjarwoto, M.Kes. Dra. Hernani, MS Drh. Wien Winarno Dra. Sukmayanti Alegantina
Pembantu Peneliti	: Sri Sugiarti Triyani Zulfikri Tri wahyuni Lestari
Pembantu Laboratorium	: Darsan
Pembantu Administrasi	: Winarsih
Konsultan	: Dr. Asikin Dr. Priyanti

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN EKSEKUTIF	i
ABSTRAK	iii
SUSUNAN TIM PENELITI	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR GRAFIK	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	2
C. Manfaat Penelitian.....	3
II. METODE PENELITIAN	
A. Kerangka Pikir	4
B. Bahan dan Cara Kerja.....	4
III. HASIL PENELITIAN	
A. Determinasi	14
B. Karakterisasi	16
C. Golongan Kimia	16
D. Uji Khasiat Antibakteri	17
E. Imunomodulator	19
IV. PEMBAHASAN	25
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	28
B. Saran	28
DAFTAR PUSTAKA	29
UCAPAN TERIMA KASIH	30
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Karakter parameter non spesifik, spesifik ekstrak daun Waru dan herba Pegagan	16
Tabel 2. Kandungan kimia ekstrak daun Waru dan herba Pegagan.....	16
Tabel 3. Uji resistensi ulang strain M.tb-MDR dan M.tb H37RV dengan media L-J pada pengamatan minggu ke-4	17
Tabel 4. Uji efektivitas ekstrak daun Waru pada strain M.tb- MDR dan M.tb H37RV dengan media L-J pada pengamatan minggu ke-4	17
Tabel 5. Daya hambat ekstrak daun Waru terhadap strain M.tb- MDR dan M.tb H37RV pada media 7H10 agar.....	18
Tabel 6. Uji efektivitas ekstrak herba Pegagan pada strain M.tb-MDR dan M.tb H37RV dengan media L-J pada pengamatan minggu ke-4.....	18
Tabel 7. Daya hambat ekstrak herba Pegagan terhadap strain M.tb-MDR dan M.tb H37RV pada media 7H10 agar.....	18
Tabel 8. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak daun Waru	19
Tabel 9. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak herba Pegagan.....	20
Tabel 10. Rata- rata berat relatif limpa setelah perlakuan kelompok ekstrak daun Waru	21
Tabel 11. Rata- rata berat relatif limpa setelah perlakuan kelompok ekstrak herba Pegagan.....	22
Tabel 12. Rata- rata kadar IgG mencit selama penelitian kelompok ekstrak daun Waru	23
Tabel 13. Rata- rata kadar IgG mencit selama penelitian kelompok ekstrak herba Pegagan.....	24

DAFTAR GAMBAR dan GRAFIK

Daftar Gambar

	Halaman
Gambar 1. Pohon Waru	14
Gambar 2. Herba Pegagan	15

Daftar Grafik

	Halaman
Grafik 1. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak daun Waru	19
Grafik 2. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak herba Pegagan	20
Grafik 3. Berat relatif limpa sesudah penelitian kelompok ekstrak daun Waru	21
Grafik 4. Berat relatif limpa sesudah penelitian kelompok ekstrak herba Pegagan	22
Grafik 5. Grafik kadar imunoglobulin G (IgG) mencit selama penelitian kelompok ekstrak daun Waru	23
Grafik 6. Grafik kadar imunoglobulin G (IgG) mencit selama penelitian Kelompok ekstrak herba Pegagan	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Persetujuan etik penggunaan hewan coba	31
Lampiran 2. Profil kromatografi ekstrak daun Waru	33
Lampiran 3. Profil kromatografi ekstrak herba Pegagan	36
Lampiran 4. Uji antibakteri	37
Lampiran 5. Skema pembuatan suspensi SDMD 1%	43
Lampiran 6. Skema kerja imunomodulator	44
Lampiran 7. Skema metode <i>radial immunodiffusion</i>	45
Lampiran 8. Data dan analisis statistik berat badan mencit kelompok ekstrak daun Waru	46
Lampiran 9. Data dan analisis statistik berat badan mencit kelompok ekstrak herba Pegagan	48
Lampiran 10. Data dan analisis statistik berat relatif iimpa mencit kelompok ekstrak daun Waru	51
Lampiran 11. Data dan analisis statistik berat relatif limpa mencit kelompok ekstrak herba Pegagan	51
Lampiran 12. Data dan analisis statistik kadar IgG mencit kelompok ekstrak daun Waru	52
Lampiran 13. Data dan analisis statistik kadar IgG mencit kelompok ekstrak herba Pegagan	56

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Di Indonesia tuberculosis (TB) paru masih merupakan masalah utama kesehatan masyarakat. Menurut hasil SKRT (1) penyakit TB menduduki peringkat ke tiga penyebab kematian setelah penyakit kardiovaskuler dan infeksi saluran pernafasan dan nomor satu dari golongan penyakit infeksi. Menurut WHO Indonesia merupakan penyumbang penyakit TB terbesar nomor 3 didunia setelah India dan China. Perkiraan WHO sekitar 563.000 penderita TB paru baru dan 140.000 kematian akibat TB tiap tahun (2).

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah memperkenalkan strategi DOTS (*Directly Observed Treatment, Shortcourse chemotherapy*), penanganan TB paru secara langsung, terawasi, cepat, dan tuntas merupakan cara memberantas TB paru yang ampuh dan efektif. Pemerintah telah melaksanakan strategi DOTS untuk pengobatan TB paru melalui Gerdunas yaitu program pengobatan gratis di Puskesmas. Tapi keberhasilan penyembuhan masih kecil (17%) (3). Kegagalan pengobatan TB paru antara lain rendahnya kepatuhan penderita minum obat dan kombinasi obat yang tidak lengkap diduga menyebabkan kekebalan ganda kuman TB paru terhadap obat antituberkulosis atau *Multi Drug Resistance* (MDR). Permasalahan yang lain, penderita TB paru pada umumnya tingkat sosial ekonominya rendah . Krisis ekonomi yang berkepanjangan menyebabkan status gizi menurun, kekebalan tubuh menurun yang berakibat semakin rentannya terinfeksi TB paru. Salah satu cara mengatasi resistensi dan meningkatkan daya tahan tubuh dapat dipertimbangkan penggunaan alternatif pengobatan, antara lain dengan tanaman obat.

Kebijakan WHO yaitu diperlukan obat yang berasal dari tanaman yang teruji secara klinis khususnya untuk penyakit TB (4). Negara Afrika selatan telah mengembangkan tanaman obat untuk TB paru. Tahapan yang dilakukan adalah screening, pembuatan ekstrak total, uji antimikrobakterium ekstrak total, fraksinasi, isolasi dan karakterisasi ekstrak maupun isolatnya, uji efek immunostimulator ekstrak total, uji efek cytotoxic dari zat aktif dengan menggunakan sel kanker maupun sel normal (5). Untuk skrening awal ekstrak total diuji terlebih dahulu dengan menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (6). Indonesia sebagai Negara tropis mempunyai banyak tanaman obat yang secara empirik atau tradisional dipakai untuk mengobati penyakit TB. Tanaman itu antara lain, Waru (*Hibiscus similis* L) (7,8); Kaki kuda/Pegagan (*Centella asiatica* L) (7,8). Tanaman tersebut selain dipakai untuk TB juga sebagai antibakteri dan dapat memperbaiki sistem kekebalan tubuh.

Data ilmiah (hasil penelitian) yang mendukung pemilihan kedua tanaman tersebut sebagai antibakteri, ekstrak herba Kaki kuda/ Pegagan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) adalah 400 mg/ml untuk *C. albicans*; untuk *S. aureus* $KHM=50\text{mg/ml}$, $KBM=100\text{mg/ml}$; untuk *E. coli* $KHM=100\text{mg/ml}$ dan $KBM=200\text{mg/ml}$ (9). Hasil penelitian (10) infus daun Waru dapat menghambat pertumbuhan bakteri tuberculosis strain H37 RV . Daun Waru mengandung zat allelopat yang dapat bersfungsi sebagai antibiotik dan tahan terhadap suhu tinggi. Kedua tanaman tersebut mengandung alkaloid, terpenoid cenderung mempunyai sifat imunostimulator (11). Hal ini memberikan gambaran bahwa tanaman obat dapat dikembangkan menjadi obat tuberkulosis (TB) paru.

Untuk uji imunitas sebagai pembanding dipakai vitamin A, karena berdasarkan penelitian terdapat hubungan antara vitamin A dengan imunitas spesifik. Defisiensi vitamin A pada mencit coba menghambat pembentukan antibodi terhadap sel darah merah domba (SDMD) dan terhadap antigen terlarut yaitu toksoid tetanus (12).

Berdasarkan uraian tersebut telah dilakukan penelitian “PENGEMBANGAN EKSTRAK DAUN WARU (*Hibiscus similis L*) dan KAKI KUDA/PEGAGAN (*Ceniella asiatica L*) SEBAGAI FITOFARMAKA ANTITUBERKULOSIS dan pada tahap pertama telah selesai “ Uji aktivitas antimikobakterium, sistem imun, dan karakterisasi ekstrak “ Pada protokol bakteri uji adalah bakteri *Mycobacterium tuberculosis typus humanus* (ATCC 27294) tapi karena sampai pelaksanaan penelitian tidak mendapatkan bakteri tersebut maka untuk penelitian ini menggunakan bakteri tuberkulosis strain MDR dan H37 RV

B. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum :

Untuk mendapatkan tanaman obat yang mempunyai karakter jelas, berkhasiat sebagai komplemen antituberkulosis dan sebagai immunomodulator.

Tujuan Khusus:

1. Menentukan karakter dari ekstrak daun Waru dan Kaki Kuda/ Pegagan
2. Membandingkan antara kelompok yang diberi bahan uji (ekstrak total masing-masing tanaman) dan kelompok kontrol dalam menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (MDR) dan H37RV secara in vitro.
3. Mengukur peningkatan konsentrasi Imunoglobulin G (IgG) mencit yang diinduksi SDMD 1% + ekstrak daun Waru dengan tiga tingkatan dosis.

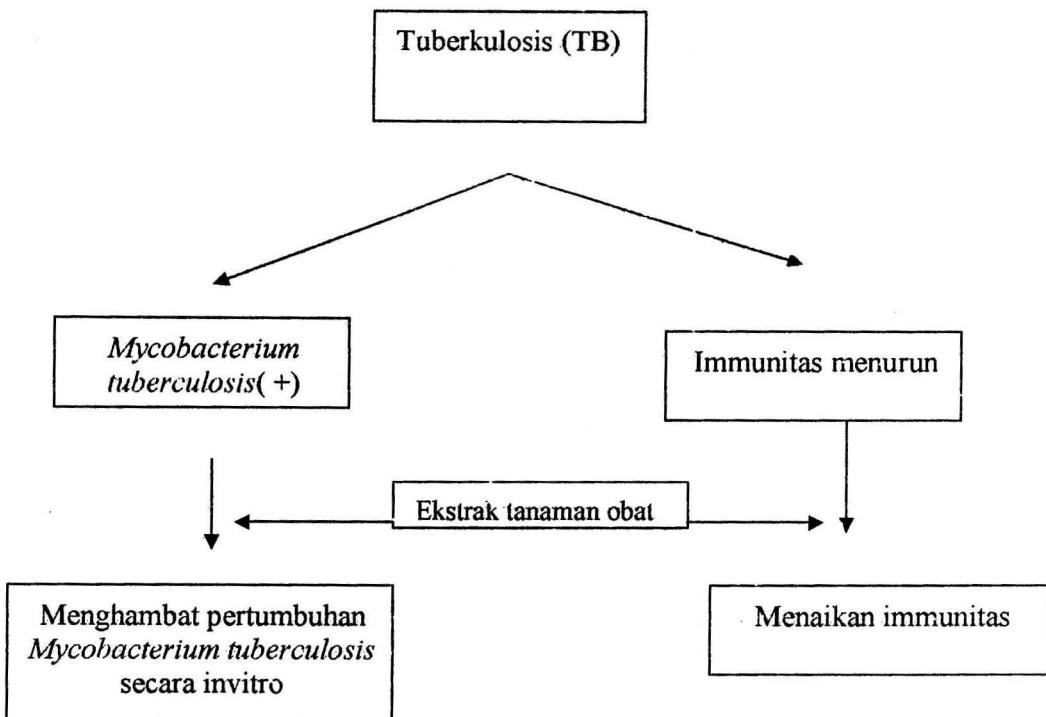
4. Mengukur peningkatan konsentrasi Imunoglobulin G (IgG) mencit yang diinduksi SDMD 1% + ekstrak herba Pegagan dengan tiga tingkatan dosis.

C. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian dapat membantu program dalam hal ini Depkes didalam mencari komplemen obat tuberkulosis yang sudah ada.
2. Hasil penelitian bermanfaat bagi masyarakat ilmiah untuk dapat dikembangkan menjadi fitofarmaka sebagai komplemen obat tuberkulosis.

II. METODE PENELITIAN

A. Kerangka Pikir



B. Bahan dan Cara Kerja

1. Bahan

Bahan Penelitian : Ekstrak daun Waru (*Hibiscus similis* L) dan herba Kaki kuda/ Pegagan (*Centella asiatica* L)

Bakteri Uji : Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MDR) dan H37VR

Hewan Coba : Mencit galur DDY, jenis kelamin jantan, berat badan 20 -30 gram

2. Cara Kerja

a. Pembuatan Ekstrak (13)

Pembuatan ekstrak secara perkolasi. Masing-masing simplisia daun Waru dan herba Pegagan diserbuk, di ayak dengan ayakan berukuran 40. Masing-masing serbuk ditimbang sejumlah kurang lebih 250 g dibasahi dengan pelarut etanol 70 % didiamkan selama 4 jam dalam wadah tertutup. Kemudian dimasukkan kedalam perkolator dari gelas, ditambah pelarut dan pelarut dialirkkan hingga kebawah sedemikian rupa sehingga diatas permukaan

masih tersisa pelarut \pm 0,5 cm dan dibiarkan selama 24 jam . kemudian kran perkolator dibuka, dibiarkan mengalir dengan kecepatan alir \pm 40 tetes/menit, ditambah pelarut sedemikian rupa sehingga pelarut diatas permukaan bahan dipertahankan \pm 2 cm. Ekstrak cair yang telah diperoleh diuapkan dalam cawan porselin yang telah ditara, kemudian diuapkan diatas tangas air dengan suhu \pm 40° C hingga etanol menguap dan diperoleh ekstrak kental. Rendemen dihitung .

b. Menentukan Karakter Ekstrak (14)

Sesuai pedoman yang dikeluarkan Badan POM maka parameter untuk karakterisasi ekstrak adalah:

1) Penetapan kadar air ekstrak

Kurang lebih sejumlah 5 gram ekstrak diletakkan pada labu destilasi kemudian ditambahkan 200 ml toluen, sebagian toluen dimasukkan kedalam tabung penerima melalui alat pendingin. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluen mendidih, suling dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit Tabung penerima pendingin hingga sulit suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, digosok dengan karet yang telah dibasahi toluen hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca. Kadar air dihitung dalam %.

2) Penetapan kadar minyak atsiri ekstrak

Ekstrak dan aquadest dicampur dalam labu penyuling, kemudian isi burct dengan air hingga penuh dan dipanaskan dengan tangas udara, sehingga penyulingan berlangsung dengan lambat tetapi teratur, setelah penyulingan selesai, dibiarkan selama \pm 15 menit. Volume minyak atsiri pada buret dicatat. Kadar minyak atsiri dihitung dalam %.

3) Penetapan kadar sisa etanol

Kadar sisa etanol dalam ekstrak etanol 50% ditetapkan menggunakan kromatografi GC MS

Head Space :

Temperature: - oven : 85 ° C

- transfer line : 90 ° C

	- needle	: 90 ° C
	- column	: 50 ° C
Time	: - Thermostate	: 10 menit
	- PII	: 3.3 menit
	- Cycle	: 2.7 menit
	- Withdraw	: 0.1 menit
	- Pressurize	: 1.3 menit
Pressure		: 13 psi

Kondisi GC- FID

Method	: FIDHS. M
Kolom	: HP Innowax 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Gas pembawa	: Helium
Kecepatan aliran	: 1.4 ml/min
Inlet temperature	: 250 ° C
Temperatur detector	: 275 ° C
Aliran gas H ₂	: 40 ml/min
Aliran gas O ₂	: 450 ml/min
Make up gas	: Helium 30 ml/min

Larutan baku pembanding

Baku pembanding : Alkohol 1% dan 5 %

Larutan uji

Dibuat larutan uji dari masing-masing ekstrak dengan kadar 1g/10 ml

Cara uji

Larutan baku pembanding dan larutan uji masing-masing disuntikkan ke dalam alat kromatograf gas sebanyak 1 ul, secara duplo.

Waktu retensi puncak utama dalam larutan uji dibandingkan terhadap puncak dalam larutan pembanding.

4) Susut pengeringan

Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105 ° C selama 30 menit dan telah ditara. Ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol , hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengering, buka tutupnya, dikeringkan pada suhu 105 ° C hingga bobot tetap.

5) Senyawa terlarut dalam pelarut air dan etanol

Dimaserasi sejumlah 2,0 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml kloroform menggunakan labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Disaring dan diuapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105° C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen senyawa yang terlarut dalam air dan etanol, dihitung terhadap ekstrak awal.

6) Tanin

5 gram serbuk dididihkan dalam 50 ml air selama 15 menit kemudian didinginkan dan disaring, sebagian filtrat direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 1 %. Jika berwarna biru tua atau hitam kehijauan berarti ada tanin Sebagian filtrat ditambahkan 15 ml pereaksi Stiasny (campuran 2 bagian v/v asam klorida), kemudian dipanaskan dipenangas air 90 ° C. Jika terbentuk endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekat, selanjutnya filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat, setelah itu ditambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1 %. Jika berwarna biru tinta atau hitam menunjukkan adanya tanin galat.

c. Penetapan Golongan Kimia Ekstrak Waru dan Pegagan

1) Flavanoid

Ditimbang tepat 10 gram ekstrak dan dimasukkan kedalam labu alas bulat kemudian ditambahkan sistem hidrolisis, yaitu 1,0 ml larutan 0,5 % b/v heksarnin, 20,0 ml aseton dan 2,0 ml larutan 25 % HCl dalam air . Dilakukan hidrolisa dengan pemanasan sampai mendidih (menggunakan “reflux”) selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring menggunakan kapas ke dalam labu ukur 100,0 ml. Residu hidrolisis ditambah 20 ml aseton untuk dididihkan kembali sebentar, dilakukan dua kali dan filtrat dikumpulkan

semua ke dalam labu ukur. Setelah labu ukur dingin maka volume ditepatkan sampai tepat 100,0 ml, kemudian dikocok sampai homogen. 20 filtrat hidrolisa di masukkan corong pisah dan tambah 20 ml air , selanjutnya dilakukan ekstraksi, pertama dengan 15 ml etilasetat, kemudian dua kali dengan 10 ml etilasetat, dan fraksi etilasetat dikumpulkan ke dalam labu ukur 50,0 ml, kemudian volume ditepatkan sampai 50,0 ml dengan etiasetat. Untuk replikasi spektrometri prosedur dilakukan 3-4 kali.

2) Flavanoid

Berdasarkan reaksi sianidin menurut Shinoda

Filtrat dari serbuk pada penetapan tanin ditambahkan 3 ml alkoholklorhidrat (campuran 2 bagian v/v etanol 50 % dengan 1 bagian v/v asam klorida pekat), Jika berwarna jingga, merah atau ungu kemungkinan ada flavanoid.

3) Turunan kinon

2 gram serbuk dibasahkan dengan 2 ml asam klorida 1 N dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 20 ml kloroform. Setelah beberapa jam, disaring dan dikocok dengan 5 ml amonia 25 %, Jika berwarna merah muda sampai merah violet menunjukkan adanya turunan kinon.

4) Saponin

0,5 gram serbuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas, setelah itu didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik sehingga terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1-10 cm. Pada penambahan satu tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang.

5) Steroid dan terpenoid

Serbuk dibuat tingtur 10 % dalam etanol 70 % (10 ml), kemudian ditambahkan 10 ml air dan 2 ml timbal (II) asetat 10 %, kemudian didiamkan selama 15 menit, dan saring. Filtrat ditampung dalam corong pisah dan dilakukan ekstraksi tiga kali dengan 5 ml kloroform. Larutan kloroform dipisahkan dan disaring melalui natrium sulfat anhidrat. Filtrat dibagi dua bagian yang masing-masing kloroformnya diuapkan diatas penangas air sampai relatif kering. Residu dari filtrat pertama dilarutkan dalam beberapa tetes asam asetat dengan satu bagian asam sulfat pekat. Jika berwarna ungu sampai biru atau hijau menunjukkan adanya steroid, merah atau coklat menunjukkan adanya triterpenoid. Residu dari filtrat kedua dilarutkan dalam larutan asam dinitrobenzoat 2 % dalam etanol dan 2

tetes larutan natrium hidroksida 1 N. Jika berwarna biru menunjukkan adanya glikosida kardenolid.

6) Alkaloid

5 gram serbuk ditarik dengan 10 ml asam klorida 0,1 N, kemudian dimaserasi selama 2 jam dan disaring. Satu mililiter filtrat ditambahkan 5 tetes pereaksi Mayer dalam tabung reaksi. Jika terbentuk endapan menunjukkan adanya alkaloid. 1 ml filtrat ditambah dengan 5 tetes pereaksi Dragendorff. Jika terbentuk endapan coklat kemerahan. Menunjukkan adanya alkaloid.

7) Penetapan Kadar Alkaloid

Ditimbang secara seksama 1 gram ekstrak dimasukkan kedalam corong pisah 125 ml pertama, kemudian ditambahkan 20 ml larutan asam sulfat (1 dalam 350) dan dikocok selama 5 menit, kemudian ditambahkan 20 ml eter, kocok hati-hati dan disaring lapisan asam dimasukkan kedalam corong pisah 125 ml kedua. Lapisan eter dikocok dua kali tiap kali dengan 10 ml larutan asam sulfat (1 dalam 350), saring tiap lapisan asam kedalam corong pisah kedua dan buang lapisan eter. Pada ekstrak asam tambahkan 10 ml natrium hidroksida dan 50 ml eter, kocok secara hati-hati, kemudian dipindahkan lapisan air kedalam corong pisah ketiga berisi 50 ml eter. Kocok corong pisah ketiga buang lapisan air, cuci lapisan eter pada corong pisah kedua dan ketiga berturut-turut dengan 20 ml air, buang lapisan air. Ekstraksi kedua lapisan eter masing-masing dengan 20 ml, 20 ml dan 5 ml larutan asam sulfat (1 dalam 70). Dilakukan ekstraksi pada corong pisah ketiga lebih dahulu, setelah itu corong pisah kedua. Campur ekstrak asam dalam labu tentukur 50 ml, encerkan dengan asam sampai tanda dan dilakukan hal yang sama terhadap 25 mg alkaloid pembanding yang tersedia. Diencerkan masing-masing 5 ml larutan uji dan larutan pembanding dengan larutan asam sulfat (1 dalam 70) hingga 100 ml dan ditetapkan serapan tiap larutan pada panjang gelombang tertentu.

d. Penetapan Profil Kromatogram

Pembuatan fraksi non polar (heksan), semi polar (etil asetat) dan polar (etanol 95 %) secara bertingkat dari ekstrak etanol.

Ditimbang sejumlah ekstrak kurang lebih 5 g, disari 3-4 kali. Setiap kali dengan 25 ml heksan hingga diperoleh kumpulan fraksi heksan, lebih kurang 100 ml ; selanjutnya sisa disari 4 kali, setiap kali dengan 25 ml etil asetat., sehingga diperoleh kumpulan fraksi

asetat lebih kurang 100 ml. Sisa disari 4 kali, setiap kali dengan 25 ml etanol sehingga diperoleh kumpulan fraksi etanol lebih kurang 100 ml. Masing-masing fraksi heksan, etil, asetat dan fraksi etanol diuapkan dalam tangas air hingga kurang lebih 1 ml, dimasukkan kedalam labu takar 5 ml secara kuantitatif, kemudian ditambah masing-masing pelarut hingga tanda. Masing-masing fraksi digunakan untuk penetapan kadar zat aktif dan penetapan profil kromatogram komponen utama dari ketiga ekstrak etanol 50 %.

e. Penetapan Profil Kromatogram Komponen Utama

Pola kromatografi ekstrak heksan dari tanaman ditetapkan dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase pengembang yang sesuai identifikasi noda ditetapkan menggunakan lampu uv pada panjang gelombang 254 nm dan pereaksi vanilin sulfat. Adapun pola kromatogram tanaman dari ekstrak etil asetat dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase pengembang yang sesuai dan identifikasi noda ditetapkan menggunakan lampu uv pada panjang gelombang 365 nm dan 254 nm. Pola kromatografi ekstrak etanol 95 % dengan fase pengembang yang sesuai untuk identifikasi noda ditetapkan menggunakan lampu uv dengan panjang gelombang 365 nm dan 254 nm. Ketiga pola kromatogram dari berbagai fraksi dilakukan densitometer.

f. Uji Khasiat Antibakteri

Untuk uji khasiat menggunakan cara (15), meliputi:

- Pembuatan media
- Penyiapan bahan uji
- Inokulasi
- Inkubasi selama 4-6 minggu.
- Pengamatan
- Pencatatan

Pemeriksaan *Mycobacterium tuberculosis (MDR) dan H37RV*

Pembuatan media (lampiran)

Penyiapan bahan uji

Media L-J dengan penambahan obat antituberkulosis konsentrasi :

- INH (Isoniasid) 0,2 mcg/ml

- ETB (Etambutol) 2 mcg/ml
- Strep (Streptomycin) 4 mcg/ml
- Rif (Rifampicyn) 40 mcg/ml

Media L-J dengan penambahan ekstrak daun Waru dan herba Pegagan:

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| ▪ WR1, dosis 36 mg/ml | PG1, dosis 22,5 mg/ml |
| ▪ WR2, dosis 24 mg/ml | PG2, dosis 15 mg/ml |
| ▪ WR3, dosis 16 mg/ml | PG3, dosis 10 mg/ml |
| ▪ WR4, dosis 10,6 mg/ml | PG4, dosis 6,6 mg/ml |
| ▪ WR5, dosis 7,1 mg/ml | PG5, dosis 4,4 mg/ml |
| ▪ WR6, dosis 4,7 mg/ml | PG6, dosis 2,9 mg/ml |

Media 7H10 agar dengan penambahan ekstrak daun Waru dan herba Pegagan:

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| ▪ WR1, dosis 36 mg/ml | PG1, dosis 22,5 mg/ml |
| ▪ WR2, dosis 24 mg/ml | PG2, dosis 15 mg/ml |
| ▪ WR3, dosis 16 mg/ml | PG3, dosis 10 mg/ml |
| ▪ WR4, dosis 10,6 mg/ml | PG4, dosis 6,6 mg/ml |
| ▪ WR5, dosis 7,1 mg/ml | PG5, dosis 4,4 mg/ml |
| ▪ WR6, dosis 4,7 mg/ml | PG6, dosis 2,9 mg/ml |

Inokulasi (Cara penanaman)

Semua media ditanamai kuman tb-MDR, tb-H37RV

Bahan inokulasi harus menyebar rata diatas permukaan media menggunakan Ose.

Tabung kita letakan pada rak miring dengan tutup yang dikendorkan.

Pembenihan yang sudah ditanami disimpan pada inkubator 37°C

Tutup tabung dengan baik dan inkubasi selama 4-6 minggu

Pengamatan

Kultur diamati pada hari ke-7 untuk golongan yang tumbuhnya cepat dan pada minggu ke-4 untuk golongan yang tumbuhnya lambat.

Kita periksa media pembenihan. Apabila pada hari ke-7 atau pada minggu ke-4 tidak terlihat adanya koloni maka inkubasi dilanjutkan sampai minggu ke-8 sebelum hasilnya dinyatakan negative.

Pencatatan dan pelaporan

- : Tidak ada pertumbuhan (sensitive)
- 6 : Sensitiv (1-4) koloni

7	: Resisten (25-100) koloni
8	: Resisten (100) koloni
9	: Resisten (>100) koloni, tumbuh merata
Y	: Kontaminasi

g. Uji Immunomodulator (16, 17)

Lima puluh ekor mencit jantan galur DDY, dengan berat badan 20-30 gram dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan,

Kelompok I	: Akuades
Kelompok II	: Kel. ekstr. daun Waru D. 4 mg/20 g bb ; Kel. ekstr. herba Pegagan D. 2,5 mg/g bb.
Kelompok III	: Kel. ekstr. daun Waru D. 12 mg/20 g bb ; Kel. ekstr. herba Pegagan D. 7,5 mg/g bb.
Kelompok IV	: Kel. ekstr. daun Waru D. 36 mg/20 g bb ; Kel. ekstr. herba Pegagan D. 22,5 mg/g bb.
Kelompok V	: Vitamin A, D. 4000 UI/20 g bb

Bahan uji diberikan secara oral selama 14 hari berturut-turut. Sebelum bahan diberikan dilakukan pengambilan darah lewat vena orbitalis untuk penetapan kadar immunoglobulin awal, kemudian diulang pengambilannya 2 minggu setelah pemberian obat. Pemisahan serum darah dilakukan dengan pemusingan pada 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang terbentuk langsung diukur kadar imunoglobulinnya atau disimpan pada suhu -20 °C hingga dipakai untuk penelitian

Parameter yang diukur:

- Berat badan, penimbangan dilakukan satu minggu sekali yaitu pada awal percobaan, minggu pertama, kedua dan akhir percobaan
- Pengukuran konsentrasi Imunoglobulin G (IgG)
Pembuatan kurve standar,
menggunakan serum standar yang telah diketahui konsentrasi yaitu

200mg/dl, diencerkan dengan larutan PBS pH 7,2 menjadi 600 mg/dl dan 300 mg/dl. Diambil 5 μ l dari masing-masing pengenceran disuntikan kedalam sumuran pada lempeng gel agarosa, diinkubasi dalam lemari pendingin selama 48 jam. Cincin presipitasi yang terbentuk diukur diameternya (mm) dengan menggunakan alat imunoviewer. Kurva standar dibuat dengan menghubungkan konsentrasi serum standar dengan kuadrat diameter cincin presipitasi.

Pengujian serum,

5 μ l serum uji disuntikan kedalam sumuran pada lempeng gel agarosa diinkubasi dalam lemari pendingin selama 48 jam. Cincin presipitasi yang terbentuk diukur diameternya dengan menggunakan alat imunoiewer. Kadar IgG (mg/dl) dapat langsung dibaca pada kurva standar berdasarkan hasil pengukuran kuadrat diameter cincin presipitasi masing-masing serum.

Penimbangan berat limpa,

Pada akhir percobaan mencit dibius dengan eter dilakukan pembedahan dari bagian inguinal sampai torakal untuk mengangkat limpa. Berat limpa ditimbang menggunakan timbangan Sartorius.

Analisis Data (18)

Data yang diperoleh dari percobaan imunomodulator dianalisa dengan ANOVA satu arah dan uji BNT.

III. HASIL PENELITIAN

A. Determinasi

1. Hasil Determinasi Waru

Divisi	:	Spermatophyta
Sub divisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Bangsa	:	Malvales
Suku	:	Malvaceae
Marga	:	Hibiscus
Jenis	:	<i>Hibiscus similis</i> Bl

2. Gambar Pohon Waru

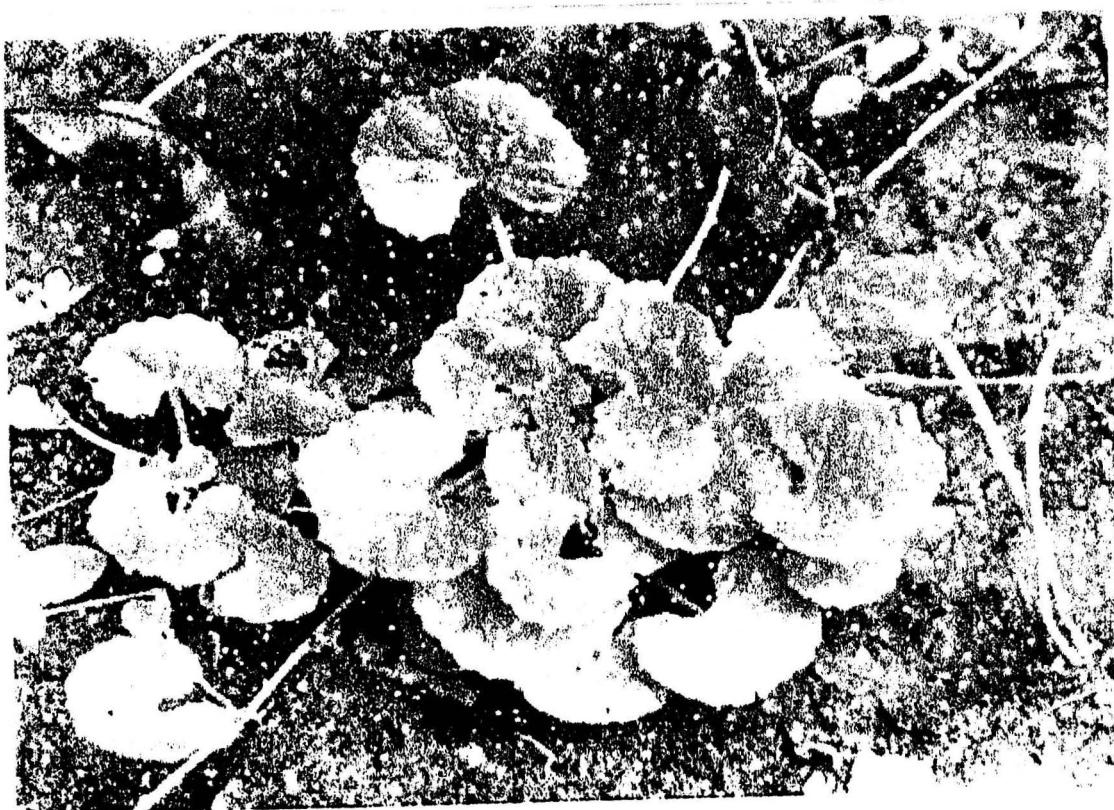


Gambar 1. Pohon Waru

3. Determinasi Herba Kaki Kuda/ Pegagan

Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Umbellales
Suku : Apiaceae
Marga : Centella
Jenis : *Centella asiatica* (L.) Urb.
Sinonim : *C. coriacea* Nannfd., *Hydrocotyle asiatica* L., *H. lumata* Lam dan
Trisanthus cochinchumensis Lour

4. Gambar Herba Kaki Kuda/ Pegagan



Gambar 2. Herba Kaki Kuda/ Pegagan

B. Karakterisasi

Karakterisasi Ekstrak Daun Waru dan Herba Pegagan

Tabel 1. Karakter parameter non spesifik, spesifik ekstrak daun Waru dan herba Pegagan

Parameter non spesifik	Nilai rata-rata (%)		
	Ekstrak daun Waru	Ekstrak herba Pegagan	Pegagan MMI
Kadar abu	6,16 ± 1,83	9,71 ± 2,01	<19
Kadar abu larut air	5,05 ± 0,61	6,18 ± 0,92	Tdk disebutkan
Kadar abu tidak larut asam	0	0,55 ± 0,09	<5
Kadar air	16,08 ± 0,02	6,39 ± 0,021	Tdk disebutkan
Parameter spesifik			
Kadar sari larut dalam air	47,10 ± 0,56	34,50 ± 0,67	>6
Kadar sari larut dalam etanol	14,82 ± 0,48	10,44 ± 0,80	>9,5
Kadar tanin	7,92 ± 0,02		
Kadar asiatikosida		1 ± 0,02	Tdk disebutkan

Keterangan

Hasil karakterisasi parameter non spesifik dan spesifik ekstrak daun Waru tidak dapat dikatakan sesuai dengan standar atau tidak karena belum tercantum dalam Materia Medika Indonesia.

Hasil karakterisasi parameter non spesifik dan spesifik ekstrak herba Pegagan sesuai dengan standar yang tercantum dalam Materia Medika Indonesia.

C. Kandungan/ Golongan Kimia

Kandungan Kimia Ekstrak Daun Waru dan Herba Pegagan

Tabel 2. Kandungan kimia ekstrak daun Waru dan herba Pegagan

Parameter	Nilai	
	Ekstrak daun Waru	Ekstrak herba Pegagan
Saponin	-	+
Steroid	-	+
Triterpen	-	+
Glikosida	-	+
Alkaloid (Dragendorf)	+	+
Alkaloid (Meyer)	+	+
Turunan kinon	-	-
Tanin	+	+
Tanin galat	+	-
Tanin katekat	-	-
Flavonoid	-	+

Keterangan

- Tidak terdeteksi

 + Terdeteksi

Hasil analisa golongan ekstrak daun Waru saponin dan triterpen tidak terdeteksi

Hasil analisa golongan ekstrak Pegagan sesuai dengan literatur dan beberapa hasil penelitian yang lain

D. Uji Khasiat Antibakteri

1. Uji Resistensi INH, RIF, Streptomycin , ETB dari M. tb-MDR dan M. tb-H37RV

Tabel 3. Uji resistensi ulang strain M.tb-MDR dan M.tb H37RV dengan media L-J pada pengamatan minggu ke-4

Strain	Jumlah koloni				
	Kontrol	INH	Strep	Rif	ETB
M.tb- MDR	100**	100**	-	100**	100**
M.tb- H37R	25-100*	-	-	-	25-100*

Keterangan

- INH : Isoniasid
- Rif : Rifampisin
- Strep : Streptomisin
- ETB : Etambutol
- : Tidak ada pertumbuhan (sensitive)
- * : Resisten (25-100) koloni
- ** : Resisten (100 koloni)

Hasil uji laboratorium sesuai dengan hasil dari RS. Persahabatan. Pada bakteri M.tb-MDR hanya Streptomisin yang sensitive sedangkan pada bakteri M.tb H37RV, ETB resisten.

2. Uji Efektivitas dan Daya Hambat Ekstrak daun Waru pada Bakteri M.tb- MDR dan M.tb H37RV

Tabel 4. Uji efektivitas strain M.tb- MDR dan M.tb H37RV dengan media L-J pada pengamatan minggu ke-4

Strain	Jumlah koloni						
	Kontrol	WR1	WR2	WR3	WR4	WR5	WR6
M.tb- MDR	100**	100**	100**	100**	100**	100**	100**
M.tb- H37RV	100**	1-4*	100**	100**	100**	100**	100**

Keterangan

- WR1: Ekstrak daun Waru 36 mg/ml ; WR2: Ekstrak daun Waru 24 mg/ml
 - WR3: Ekstrak daun Waru 16 mg/ml ; WR4: Ekstrak daun Waru 10,6 mg/ml
 - WR5: Ekstrak daun Waru 7,1 mg/ml ; WR6: Ekstrak daun Waru 4,7 mg/ml
 - * : sensitive (1-4) koloni
 - ** : Resisten (100 koloni)
- Ekstrak daun Waru (6 konsentrasi) tidak efektif terhadap M.tb- MDR tapi untuk M.tb-H37RV ekstrak daun Waru 36 mg/ml efektif.

Tabel. 5. Daya hambat ekstrak daun Waru terhadap strain M.tb- MDR dan M.tb H37RV pada media 7H10 agar.

Strain	Hambatan pertumbuhan kuman pada						
	Kontrol	WR1	WR2	WR3	WR4	WR5	WR6
M.tb- MDR	-	-	-	-	-	-	-
M.tb- H37RV	-	+	+	-	-	-	-

Keterangan: + terdapat hambatan pertumbuhan

- tidak terdapat hambatan pertumbuhan

Ekstrak daun Waru 36 mg/ml dan 24 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan bakteri M.tb H37RV pada media 7H10 agar.

3. Uji Efektivitas dan Daya Hambat Ekstrak Herba Pegagan pada Bakteri M.tb- MDR dan M.tb H37RV

Tabel. 6. Uji efektivitas strain M.tb-MDR dan M.tb H37RV dengan media L-J pada pengamatan minggu ke-4

Strain	Jumlah koloni						
	Kontrol	PG1	PG2	PG3	PG4	PG5	PG6
M.tb-MDR	100**	100**	100**	100**	100**	100**	100**
M.tb-H37RV	100**	25-100*	100**	100**	100**	100**	100**

Keterangan

PG1: Ekstrak herba Pegagan 22,5 mg/ml ; PG2: Ekstrak herba Pegagan 15 mg/ml

PG3: Ekstrak herba Pegagan 10 mg/ml ; PG4: Ekstrak herba Pegagan 6,6 mg/ml

PG5: Ekstrak herba Pegagan 4,4 mg/ml ; PG6: Ekstrak herba Pegagan 2,9 mg/ml

*). : Resisten (25-100) koloni

**). : Resisten (100 koloni)

Ekstrak herba Pegagan (6 konsentrasi) tidak efektif terhadap M.tb- MDR tapi untuk M.tb- H37RV ekstrak herba Pegagan 22,5 mg/ml efektif.

Tabel 7. Daya hambat ekstrak herba Pegagan terhadap strain M.tb- MDR dan M.tb- H37RV pada media 7H10 agar.

Strain	Pertumbuhan kuman pada						
	Kontrol	PG1	PG2	PG3	PG4	PG5	PG6
M.tb- MDR	-	-	-	-	-	-	-
M.tb- H37RV	-	+	+	-	-	-	-

Keterangan: + terdapat hambatan pertumbuhan

- tidak terdapat hambatan pertumbuhan

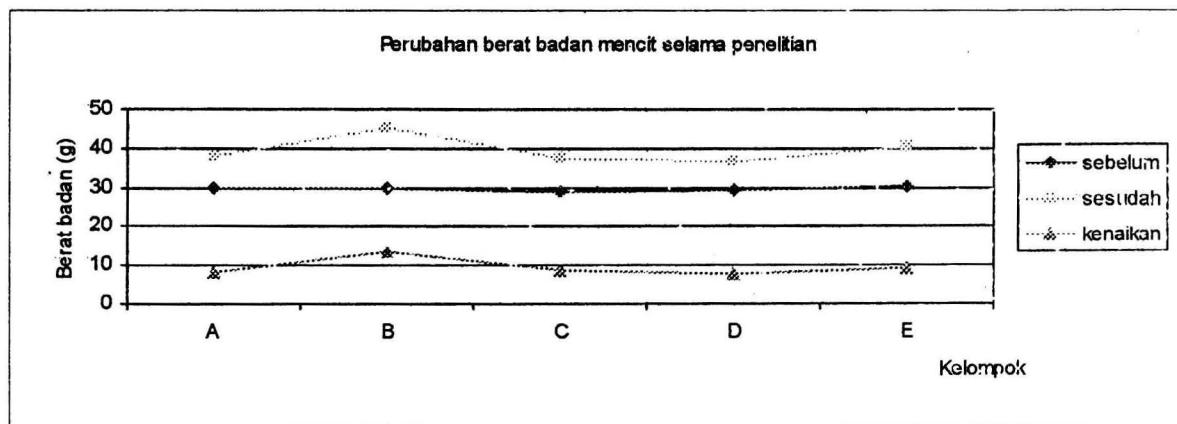
Ekstrak herba Pegagan 22,5 mg/ml dan 15 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan bakteri M.tb-H37RV pada media 7H10 agar.

E. Immunomodulator

1. Berat Badan Mencit

Tabel 8. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak daun Waru

Perlakuan	Rata- rata berat badan (g)		
	Sebelum (n=8)	Sesudah (n=8)	Kenaikan (n=8)
A. Akuades	33,25 ± 2,12	37,75 ± 1,28	4,50 ± 1,19
B. Vit A D.4000UI/20 g bb	29,87 ± 0,35	45,12 ± 1,88	15,25 ± 1,75**
C. Ekstr.Waru D.4 mg/20 g bb	29,75 ± 1,98	37,50 ± 1,92	7,75 ± 0,70
D. Ekstr.Waru D.12 mg/20 g bb	29,00 ± 2,13	36,75 ± 2,71	7,75 ± 1,03
E. Ekstr.Waru D.36 mg/20 g bb	31,25 ± 1,83	40,62 ± 3,42	9,37 ± 2,32



Grafik 1. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak daun Waru

Keterangan

Rata- rata berat badan mencit sebelum perlakuan tidak ada beda nyata ($p=0,051$)

Antara kelompok yang diberi akuades dan Vit A D.4000UI/20 g bb ada beda sangat nyata ($p=0,000$)

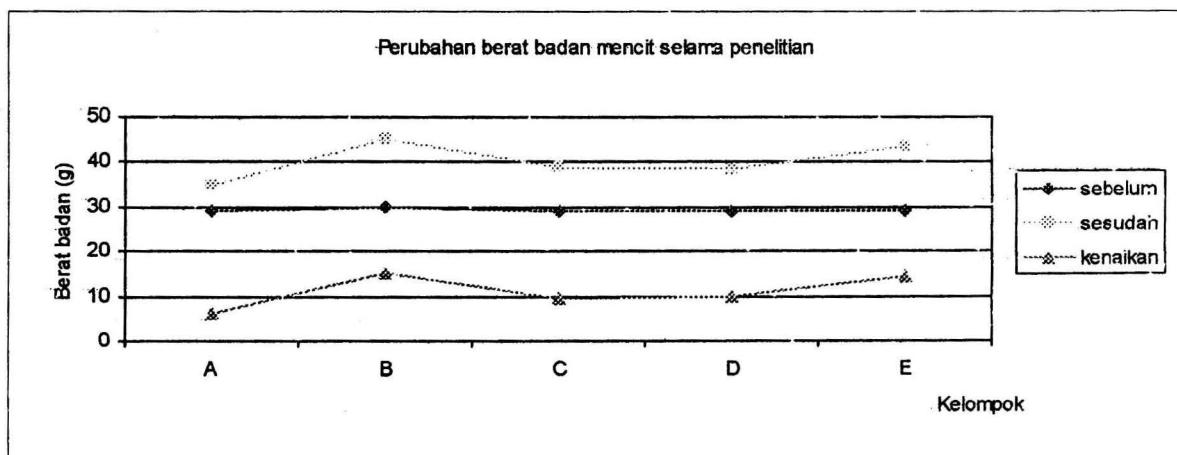
Antara kelompok yang diberi akuades dan ekstrak daun Waru dosis 4 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=0,588$)

Antara kelompok yang diberi akuades dan ekstrak daun Waru dosis 12 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=0,706$)

Antara kelompok yang diberi akuades dan ekstrak daun Waru dosis 36 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=0,142$)

Tabel 9. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak herba Pegagan

Perlakuan	Rata- rata berat badan (g)		
	Sebelum (n=8)	Sesudah (n=8)	Kenaikan (n=8)
A. Akuades	29,00 ± 1,41	35,00 ± 1,60	6,00 ± 1,06
B. Vit A D.4000UI/20 g bb	29,87 ± 0,35	45,12 ± 1,88	15,25 ± 1,75**
C. Ekstr. Pegagan D. 2,5 mg/20 g bb	29,25 ± 1,28	38,75 ± 0,88	9,50± 1,30
D. Ekstr. Pegagan D. 7,5 mg/20 g bb	29,00 ± 0,75	38,50 ± 0,75	9,75 ± 0,75
E. Ekstr.Pegagan D. 22,5 mg/20 g bb	29,00 ± 1,19	43,50 ± 1,41	14,50 ± 2,07**



Grafik 2. Rata- rata berat badan mencit selama penelitian kelompok ekstrak herba Pegagan

Keterangan

Rata- rata berat badan mencit sebelum perlakuan tidak ada beda nyata ($p=0,422$)

Antara kelompok yang diberi akuades dan Vit A D.4000UI/20 g bb ada beda sangat nyata ($p=0,000$)

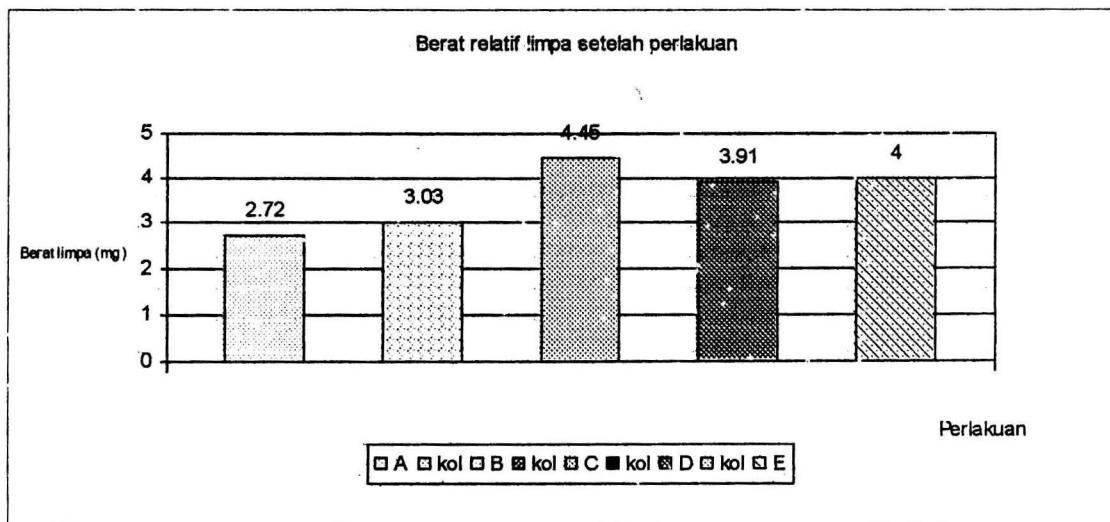
Antara kelompok yang diberi akuades dan ekstrak herba Pegagan dosis 22,5 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p= 0,314$)

Antara kelompok yang diberi dosis ekstrak herba Pegagan dosis 2,5 mg/20 g bb dan ekstrak herba Pegagan dosis 7,5 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=1,00$)

2. Berat Limpa

Tabel 10. Rata- rata berat relatif limpa setelah perlakuan kelompok ekstrak daun Waru

Perlakuan	N	Rata-rata Berat limpa (mg)
A. Akuades	8	2,72 ± 0,16
B. Vit A D.4000UI/20 g bb	8	3,02 ± 1,50
C. Ekstr. Waru D.4 mg/20 g bb	8	4,45 ± 0,99
D. Ekstr. Waru D.12 mg/20 g bb	8	3,91 ± 1,48
E. Ekstr. Waru D.36 mg/20 g bb	8	4,00 ± 1,63



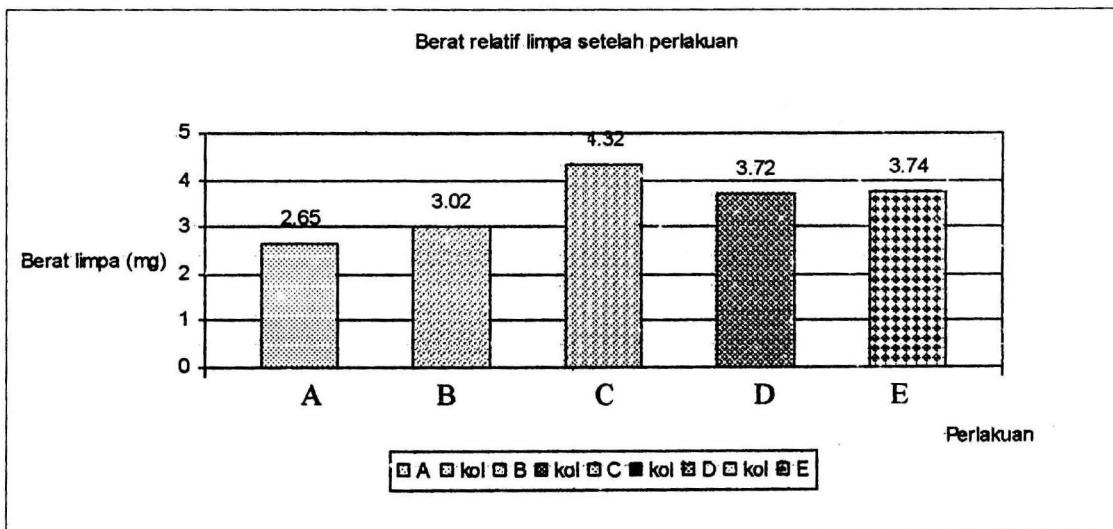
Grafik 3. Berat relatif limpa sesudah penelitian

Keterangan

Berat relatif limpa antar kelompok perlakuan sesudah perlakuan tidak ada beda nyata ($p=0,078$)

Tabel 11. Rata- rata berat relatif limpa setelah perlakuan kelompok ekstrak herba Pegagan

Perlakuan	N	Rata-rata berat limpa (mg)
A. Akuades	8	2,65 ± 0,34
B. Vit A D.4000UI/20 g bb	8	3,02 ± 1,50
C. Ekstr. Pegagan D. 2,5 mg/20 g bb	8	4,32 ± 0,99
D. Ekstr. Pegagan D. 7,5 mg/20 g bb	8	3,72 ± 1,35
E. Ekstr.Pegagan D. 22,5 mg/20 g bb	8	3,74 ± 1,40



Grafik 4. Berat relatif limpa sesudah penelitian

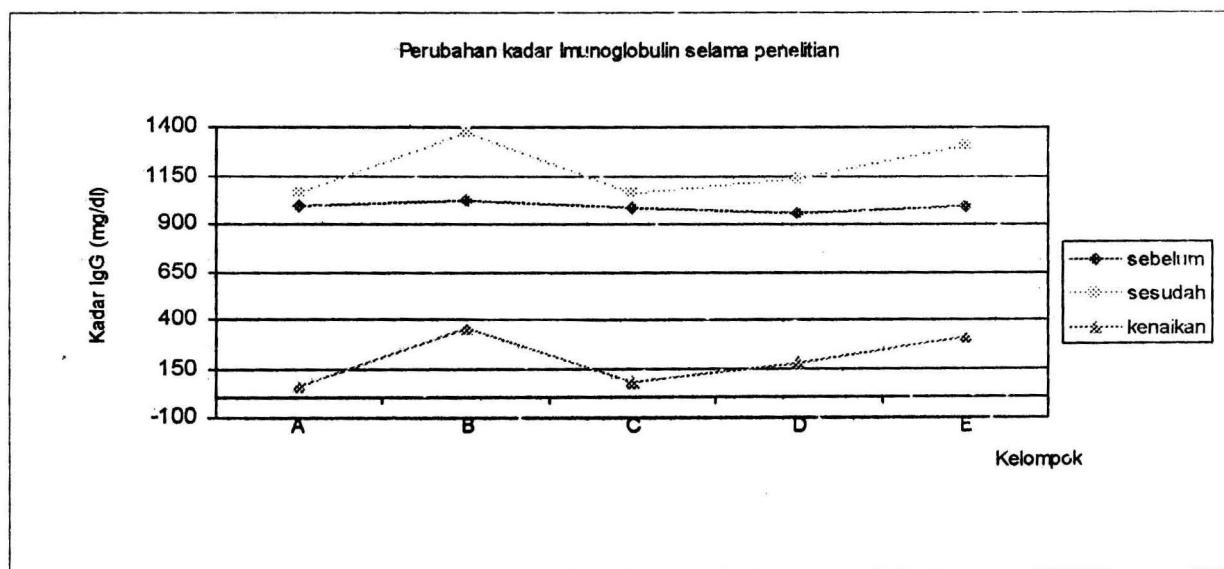
Keterangan

Berat relatif limpa antar kelompok perlakuan sesudah perlakuan tidak ada beda nyata ($p=0,075$)

3. Kadar Imunoglobulin

Tabel 12. Rata- rata kadar IgG mencit selama penelitian
kelompok ekstrak daun Waru

Perlakuan	Rata- rata kadar IgG (mg/dl)		
	Sebelum (n=8)	Sesudah (n=8)	Kenaikan (n=8)
A. Akuades	961,88 ± 71,87	1060,63 ± 95,45	61,87 ± 33,34
B. Vit A D.4000UI/20 g bb	998,75 ± 99,13	1370,00 ± 72,94	350,25 ± 122,00**
C. Ekstr.Waru D.4 mg/20 g bb	1019,75 ± 111,86	1064,88 ± 42,07	76,25 ± 45,45
D. Ekstr.Waru D.12 mg/20 g bb	988,63 ± 50,46	1131,75 ± 96,96	169,25 ± 129,98*
E. Ekstr.Waru D.36 mg/20 g bb	962,75 ± 81,13	1003,75 ± 81,16	310,37 ± 139,08**



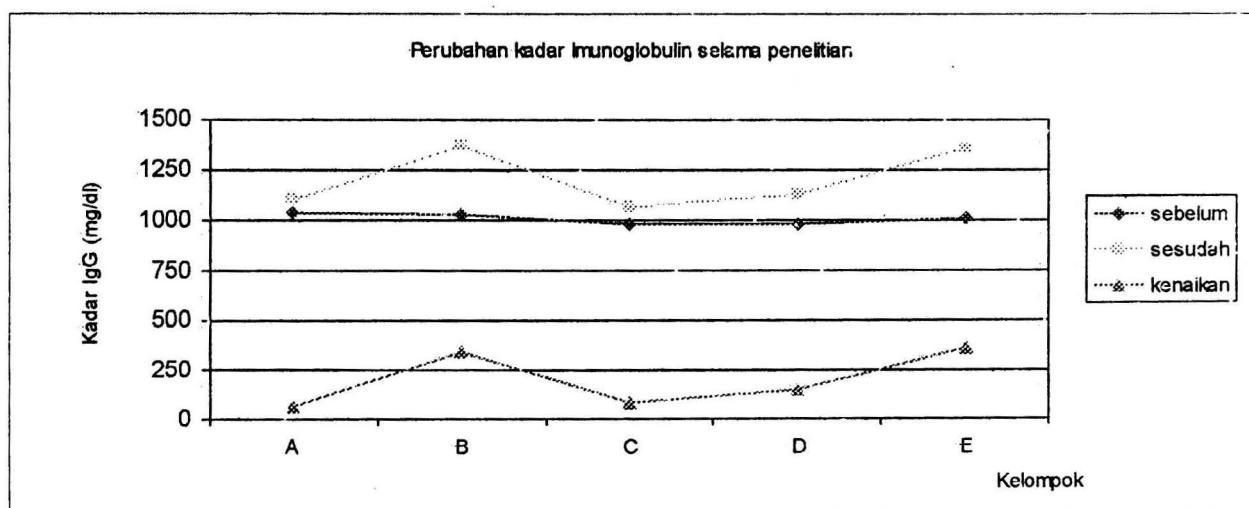
Gambar 5. Grafik kadar imunoglobulin G (IgG) mencit selama penelitian

Keterangan

- Kadar IgG antar kelompok perlakuan tidak ada beda nyata ($p=0,771$)
- Antara kelompok akuades dan Vitamin A dosis 400 UI/20 g bb ada beda sangat nyata ($p=0,000$)
- Antara kelompok akuades dan ekstrak daun Waru dosis 4 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=0,764$)
- Antara kelompok akuades dan ekstrak daun Waru dosis 12 mg/20 g bb ada beda nyata ($p=0,029$)
- Antara kelompok akuades dan ekstrak daun Waru dosis 36 mg/20 g bb ada beda sangat nyata ($p=0,000$)
- Antara kelompok Vitamin A dosis 400 UI/20 g bb dan ekstrak daun Waru dosis 36 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=0,407$)

Tabel 13. Rata-rata kadar IgG sebelum perlakuan kelompok ekstrak herba Pegagan

Perlakuan	Rata- rata kadar IgG (mg/dl)		
	Sebelum (n=8)	Sesudah (n=8)	Kenaikan (n=8)
A. Akuades	978,00 ± 65,19	1101,75 ± 92,16	67,12 ± 19,61
B. Vit A D.4000UI/20 g bb	1034,13 ± 113,42	1368,13 ± 74,73	347,87 ± 124,56**
C. Ekstr.Pegagan D.2,5mg/20g bb	1020,25 ± 111,51	1059,75 ± 72,59	82,00 ± 32,84
D. Ekstr.Pegagan D.7,5mg/20g bb	977,75 ± 121,27	1124,88 ± 87,82	148,62 ± 35,97*
E. Ekstr.PegaganD.22,5mg/20g bb	976,25 ± 124,65	1363,63 ± 71,42	361,25 ± 85,34**



Gambar 6. Grafik kadar imunoglobulin G (IgG) mencit selama penelitian

Keterangan

Antar perlakuan tidak ada beda nyata ($p=0,827$)

Antara kelompok akuades dan Vitamin A dosis 400 UI/20 g bb ada beda sangat nyata ($p=0,000$)

Antara kelompok akuades dan ekstrak herba Pegagan dosis 2,5 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=0,651$)

Antara kelompok akuades dan ekstrak herba Pegagan dosis 7,5 mg/20 g bb ada beda nyata ($p=0,017$)

Antara kelompok akuades dan ekstrak herba Pegagan dosis 22,5 mg/20 g bb ada beda sangat nyata ($p=0,000$)

Antara kelompok Vitamin A dosis 400 UI/20 g bb dan ekstrak herba Pegagan dosis 22,5 mg/20 g bb tidak ada beda nyata ($p=0,684$)

IV. PEMBAHASAN

Ekstraksi daun Waru menghasilkan rendemen sebesar 21% dan hasil karakterisasi non spesifik dan spesifik ekstrak daun Waru (tabel 1). Dalam Materia Medika Indonesia belum tercantum batas maksimum yang diperbolehkan dari parameter tersebut, jadi untuk sementara hasil ini dapat dipakai sebagai acuan karakterisasi non spesifik dan spesifik ekstrak daun Waru. Ekstraksi herba Pegagan menghasilkan rendemen sebesar 8,4 % dan hasil karakterisasi non spesifik dan spesifik ekstrak herba Pegagan (tabel 1). Kualitas dari bahan baku (ekstrak) masih memenuhi persyaratan yang ditentukan oleh MMI (19), dengan kadar abu jauh lebih kecil dibandingkan kedua persyaratan tersebut. Kemungkinannya karena kandungan mineral, seperti kalium, kalsium, dan fosfor yang ada tidak terlalu tinggi sehingga akan mempengaruhi nilai kadar abunya.

Golongan kimia yang diperoleh dari ekstrak daun Waru adalah alkaloid dan tanin (tabel 2), dari literatur (21) menyebutkan daun Waru mengandung saponin, tanin, alkaloid, flavonoid. Jadi hasil yang diperoleh berbeda hal ini kemungkinan karena asal, umur tanaman yang tidak sama yang berpengaruh pada kandungan kimia dari daun Waru. Golongan kimia yang diperoleh dari ekstrak herba Pegagan adalah saponin, steroid, triterpen, glikosida, alkaloid, tanin, flavonoid (tabel 2), dari literatur (19) menyebutkan herba Pegagan mempunyai kandungan kimia saponin, steroid, triterpen, glikosida, alkaloid, tanin, flavonoid. Jadi hasil yang diperoleh sesuai dengan standar dari MMI.

Uji khasiat antibakteri, uji kontrol kualitas laboratorium dari INH, Rifampisin, Streptomisin dan Etambutol terhadap strain M.tb- MDR hasilnya sama dengan di Rumah Sakit Persahabatan yaitu resisten INH, Rifampisin, Etambutol dan sensitive Streptomisin. Sedangkan menggunakan strain M.tb - H37RV hasilnya hanya resisten ETB (tabel 3). Hasil uji efektivitas ekstrak daun Waru 36 mg/ml untuk strain M.tb - H37RV pada media L-J menunjukkan adanya daya hambat tapi untuk strain M.tb- MDR tidak menunjukkan adanya hambatan. Sedangkan pada media 7H10 agar ekstrak daun Waru 36 dan 24 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan bakteri M.tb - H37RV. Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian (10) yaitu infus daun Waru dapat menghambat pertumbuhan bakteri M.tb - H37RV. Hasil uji efektivitas ekstrak herba Pegagan 22,5 mg/ml untuk strain TB- H37RV menunjukkan adanya daya hambat tapi untuk strain M.tb- MDR tidak menunjukkan adanya hambatan. Sedangkan pada media 7H10 agar ekstrak herba Pegagan 36 dan 24 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan bakteri M.tb - H37RV.

Uji imunomodulator, pemberian suspensi SDMD (Sel darah merah domba) 1% pada mencit adalah untuk merangsang pembentukan antibodi spesifik, SDMD 1% mempunyai sifat antigenik yang tinggi. Pembuatan suspensi SDMD 1% menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebagai larutan pencuci dan pengencer, larutan PBS merupakan larutan dapar isotonis dengan pH 7,2. Antigen adalah bahan yang dapat merangsang respon imun atau bahan yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada. Sebagai kontrol positif dipakai vitamin A dengan dasar bahwa beberapa penelitian membuktikan bahwa kekurangan vitamin A menurunkan daya tahan tubuh terhadap beberapa penyakit. Sebaliknya beberapa penyakit diketahui sangat mengurangi daya tahan tubuh, misalnya morbili ternyata disertai penurunan kadar vitamin A dalam serum. Uji imunomodulator untuk ekstrak daun Waru, kadar IgG pada awal percobaan tidak ada beda nyata antar perlakuan ($p=0,771$) dan setelah pemberian ekstrak daun Waru antar perlakuan ada beda sangat nyata ($p=0,000$). Kenaikan kadar IgG setelah pemberian ekstrak daun Waru dosis 4; 12 dan 36 mg/20 g bb pada mencit yang diinduksi SDMD 1% adalah 76,25; 169,25 dan 310,37 mg/dl. Hasil ini secara statistik dosis 12 dan 36 mg/20 g bb ada beda nyata dan sangat nyata ($p=0,029$ dan $0,000$), dibanding kelompok yang diberi akuades. Kelompok yang diberi Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb tidak ada beda nyata dibanding ekstrak daun Waru dosis 36 mg/20 g bb ($p=0,407$). Jadi ekstrak daun Waru dosis 36mg/20 g bb mempunyai potensi yang sama dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb. Pemberian ekstrak Pegagan mampu meningkatkan produksi antibodi, dosis 2,5; 7,5 dan 22,5 mg/20 g bb dapat meningkatkan kadar IgG sebesar 82,00; 148,62 dan 361,25 mg/dl. Peningkatan tersebut apabila dibanding dengan kelompok akuades, ekstrak herba Pegagan dosis 7,5 dan 22,5 mg/20 g bb ada beda nyata dan ada beda sangat nyata ($p=0,017$; $0,000$). Sedangkan kelompok yang diberi Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb tidak ada beda nyata dibanding ekstrak herba Pegagan dosis 22,5 mg/20 g bb tidak ada beda ($p=0,684$). Berarti ekstrak herba Pegagan dosis 22,5 mg/20 g bb khasiatnya sebanding dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb dalam meningkatkan kadar IgG mencit yang diinduksi SDMD 1%.

Kelompok induksi SDMD 1% + akuades (kedua kelompok penelitian) terjadi respon imun primer dengan kenaikan jumlah antibodi (kadar IgG). Produksi antibodi sebanding dengan jumlah antigen yang disuntikan tetapi lama kelamaan jumlah antigen berkurang maka antibodi yang terbentuk atas rangsangan antigen juga berkurang dan hal ini terlihat dengan lambatnya peningkatan kadar IgG. Pada kelompok yang diberi ekstrak daun Waru, herba Pegagan dan Vitamin A peningkatan kadar IgG nya lebih tinggi dibanding dengan kelompok akuades yang berarti ekstrak daun Waru, herba Pegagan dan

Vitamin A dapat memacu respon imun. Berbagai penelitian menunjukkan adanya hubungan antara vitamin A dengan imunitas spesifik. Penyakit morbili yang biasanya disertai penurunan daya tahan tubuh terhadap infeksi sekunder ternyata disertai penurunan kadar vitamin A dalam darah (12,16). Oleh karena itu pemakaian vitamin A sebagai pembanding dapat dipertanggungjawabkan. IgG merupakan komponen utama imunoglobulin serum dengan berat molekul 160.000 dalton. Kadarnya dalam serum sekitar 13 mg/ml, merupakan 75% dari semua imunoglobulin. IgG ditemukan dalam berbagai cairan antara lain cairan serebrospinal(CSF) dan juga urin. IgG juga berperan imunitas seluler karena dapat merusak antigen seluler melalui interaksi dengan sistem komplemen.

Pegagan mengandung vitamin B komplek, terutama B₁, B₂ dan B₆ yang dianggap mempunyai efek yang bermanfaat terhadap otak. Untuk 100 g daun segar mengandung 34 kalori, protein 1,6 – 2 g, lemak 0,2 - 0,6 g, karbohidrat 6,9 g, serat 1,6 - 2 g, abu 1,6 g, β karoten, tiamin (B₁) 0,15 mg, B₂ 0,14 mg, niasin 1,2 mg, asam askorbat 4 – 49 mg, provitamin A 4,5 mg, kalsium 170 mg, fosfor 30 – 32 mg, besi 3,1 – 6 mg, kalium 414 mg dan kandungan airnya 88 % (20,21). Selain itu, ditemukan juga asam-asam amino bebas terutama aspartat, glutamat, serin, threonin, lisin, alanin, histidin dan amino butirat. Oleh karena kandungan kimia yang sangat lengkap dari herba Pegagan maka ekstrak herba Pegagan sangat tepat dipakai sebagai komplemen dalam pengobatan TB. Seperti kita ketahui dalam pengobatan TB dengan menggunakan INH pasien masih diberi tambahan vitamin B6 untuk mencegah neuritis perifer, jadi Pegagan selain dapat meningkatkan imunitas juga berkhasiat dalam meningkatkan gizi, hal ini terlihat dengan meningkatnya berat badan mencit secara nyata pada dosis 22,5 mg/20 g bb (tabel 9). Penelitian daun Waru belum banyak dilakukan, kemungkinan ekstrak daun Waru dapat dipakai sebagai komplemen pada pengobatan TB karena mengandung zat alelopat yang berfungsi sebagai antibiotik dan meningkatkan imunitas.

Sel-sel sistem imun ditemukan dalam jaringan dan organ yang disebut sistem limfoid. Organ limfoid dapat dibagi dalam organ limfoid primer dan sekunder. Limpa merupakan salah satu organ limfoid sekunder. Oleh karena itu selain kadar IgG untuk mengetahui respon imun berat limpa dapat dipakai parameter penelitian. Berat limpa dalam keadaan dalam keadaan penurunan antibodi akan berkurang karena berkurangnya sel-sel pembentuk antibodi dan sel-sel limfosit T. Hasil yang diperoleh dari penelitian kelompok ekstrak daun Waru maupun kelompok ekstrak herba Pegagan berat limpa tidak berbeda bermakna dibanding akuades.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Ekstrak daun Waru dan Herba Pegagan yang digunakan untuk penelitian mempunyai karakter yang jelas dan ekstrak Herba Pegagan sesuai dengan pedoman yang ditetapkan.
2. Ekstrak daun Waru (*Hibiscus similis L*) dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis H37VR* tapi tidak menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis MDR*
3. Ekstrak Kaki kuda/Pegagan (*Centella asiatica L*) dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis H37VR* tapi tidak menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis MDR*
4. Ekstrak Waru (*Hibiscus similis L*) dosis 36 mg/20 g bb dapat meningkatkan kadar Imunoglobulin G sebesar 310,375 mg/dl sebanding dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb ($p=0,407$)
5. Ekstrak Kaki kuda/Pegagan (*Centella asiatica L*) dosis 22,5 mg/dl dapat meningkatkan kadar Imunoglobulin G 361,25 mg/dl sebanding dengan Vitamin A dosis 4000 UI/20 g bb ($p=0,684$)

B. Saran

1. Hasil penelitian dapat membantu program dalam hal ini Depkes bahwa ekstrak daun Waru dan herba Pegagan dapat dimanfaatkan sebagai komplementer obat tuberkulosis yang sudah ada.
2. Bagi masyarakat ilmiah untuk dapat mengembangkan daun Waru dan herba Pegagan menjadi fitofarmaka untuk komplementer pengobatan tuberkulosis
3. Untuk melengkapi data ilmiah diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai keamanan pemakaian (toksisitas akut dan subkronik) daun Waru dan herba Pegagan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan selesainya penelitian ini kami ucapkan terima kasih kepada teman- teman yang secara langsung maupun tidak langsung telah banyak membantu dari pembuatan proposal, protokol, pelaksanaan penelitian sampai membuat laporan. Untuk itu kami ucapkan terima kasih kepada,

1. Rekan- rekan di Laboratorium Eksperimental Puslitbang Farmasi & OT, teman- teman di- Toksikologi PPOM, pak Achyar, Nita yang telah banyak membantu mulai dari penyiapan bahan sampai dengan pelaksanaan penelitian.
2. Bapak Kusmardi dari bagian Patologi FK. UI yang telah banyak membantu terutama pada uji imunitas dan pengolahan data.

Semoga kebaikan bapak, ibu dan teman- teman semua memperoleh balasan dari Tuhan Y.M.E. Amin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. (1995). Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT). Departemen Kesehatan RI
2. Aditama, TY., ZS. Priyanti.(2000). Tuberkulosis. Diagnosis, Terapi dan Masalahnya. Lab. Mikobakteriologi RSUP Persahabatan/ WHO Collaborating Center for Tuberculosis, Hal 79-98.
3. Anonim.(2001). Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis. Cetakan ke 6. Departemen Kesehatan, Hal 1-8.
4. WHO. Tradisional Medicine.(2000). *Better Science, Policy and Service for Health Developement*. WHO Kobe Centre, Hal 45-52
5. Folb, P., Smith, P., Steyn, L. et al. (2001). *The in vitro efficacy test of plants used in the tradisional treatment of tuberculosis in Southerd Africa against Mycobacterium Southerd Africa Project*.
6. Gentry, EJ., Jampani, HB., Shokri, AK, et al. (1998). *Antitubercular Natural Products: Berberin from the Roots of Commercial Hydrastis Canadensis Powder*. J.Nat.Prod, 61: 1187-1193
7. Perry, LM. (1980). *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*. The MIT.
8. Padua at al.(1999). *Medicinal and Poisonous Plants I*. Prosea.
9. Widowati, L. (1995). Penelitian Tanaman Obat Di Beberapa Perguruan Tinggi Di Indonesia. VII. Puslitbang Farmasi Badan Litbangkes.
10. Misnadiarly, NS. Aminah. (1993). Studi Pendahuluan Pengaruh Ekstrak Daun Hibiscus similis (Waru) Terhadap Kuman *Mycobacterium tuberculosis* H37 RV di Laboratorium. Cermin Dunia Kedokteran No. 84.
11. Wagner, Hildebert. (1984). *Immunostimulants of Fungi and Higher Plants*. Defination Scope aims Stimulants.
12. Sadikin, M. dkk. (1994). Vitamin A dan Imunitas: Peningkatan Titer Antibodi pada Tikus yang Disuntik dengan Vitamin A. MKI., Vol:44, No.12:737-742.
13. Anonim. (1985) . Farmakope Indonesia. Ed.4. Ditjen POM. Jakarta.
14. Anonim. (2000). Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat. Badan POM.
15. Anonim.(2001.). *Manual of Analytical Methods for Mycobacterium tuberculosis*. TDH Directory of Laboratory Services.
16. Sadikin, M, dkk (1995). Vitamin A dan Imunitas: Peningkatan Titer Antibodi Tikus Anti Sel Darah Merah Domba Oleh Pemberian Vitamin A Secara Oral. Majalah Kedokteran Indonesia. Vol. 45, No.7.
17. Abbas, AK., Lictman, AH., Poher, JS. (1991). *Celluler and Molecular Immunology*. Saunders. Co. Phillipadelpia.
18. Milton, J. (1991). *Statistica Methods in the Biological and Health Sciences*. New York,
19. Depkes. 1977. Materia Medika Indonesia. Jilid I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. hal:169.
20. Hernani, C. Winarti dan Sudiarto. 1998. Kajian aspek pengeringan pegagan terhadap mutu dan kadar bahan aktif asiatiskosida. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi, PATPI-PAU UGM-F.TP UGM, Yogyakarta : 53-57
21. Indofarma. 2000. *Brief monography of 10 Indonesian herbal medicines*. Indofarma, Jakarta : 7-11.

**KOMISI PENGGUNAAN HEWAN PERCOBAAN
FARMAKOLOGI EKSPERIMENTAL KPPOT
PUSLITBANG FARMASI DAN OBAT TRADISIONAL**

No. Kode: 00.9.../kphp

1. Nama Percobaan : Penelitian Immunomodulator
2. No. Protokol :
3. Bahan Uji : Ekstrak daun Waru dan Ekstrak Herba Pegagan
4. Nama Pengusul : Dra. Yun Astuti Nugroho
5. Instansi Pengusul : KPP. Obat Tradisional. Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional
6. Hewan Uji :
 1. Jenis : Mencit
 2. Strain/ Galur : C3H
 3. Asal : Patologi UI
 4. Jenis Kelamin : Jantan
 5. Umur : 3 bulan
 6. Berat Badan : 25 – 30 gram
 7. Jumlah Hewan : 100 ekor (untuk 2 ekstrak)
 8. Makanan : Pelet
 9. Minum : Air kran
 10. Makanan Tambahan :-
 11. Aklimatisasi hewan : Ya/ tidak ; Berapa hari : 7 hari
 12. Jenis dan Ukuran Kandang Percobaan : Aluminium
(35x20x15 cm)
 13. Berapa ekor hewan dalam kandang percobaan : 3 ekor/ kandang

14. Suhu kamar pemeliharaan hewan	: 30°C
15. Pencahayaan kamar pemeliharaan hewan	: Lampu listrik PLN
16. Ventilasi kamar pemeliharaan hewan	: Cukup
17. Pemeliharaan kesehatan hewan	: Dilakukan setiap hari
18. Cara pemberian bahan uji	: Per-oral
19. Dosis bahan uji	: 3 macam tingkatan dosis sesuai LD ₅₀
20. Lama pemberian bahan uji	: 14 hari
21. Tindakan operasi	: -
22. Anastesia	: -
23. Parameter apa yang ingin diketahui	: Kadar IgG, gambaran histopatologi
24. Tindakan akhir percobaan	: dikorbankan/dipelihara/lain
25. Cara pengorbanan	: Dislokasi
26. Otopsi/ organ yang diambil	: Lympha
27. Spesimen lain yang diambil	: -
28. Pemusnahan karkas dengan cara apa, sebutkan: Dibakar	
29. Lain –lain	:

Jakarta, 10 – April - 2003

Disetujui/ Tidak disetujui

Pengusul

Komisi Penggunaan Hewan Percobaan
Farmakologi Eksperimental KPPOT
Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional

Dra. Yun Astuti Nugroho

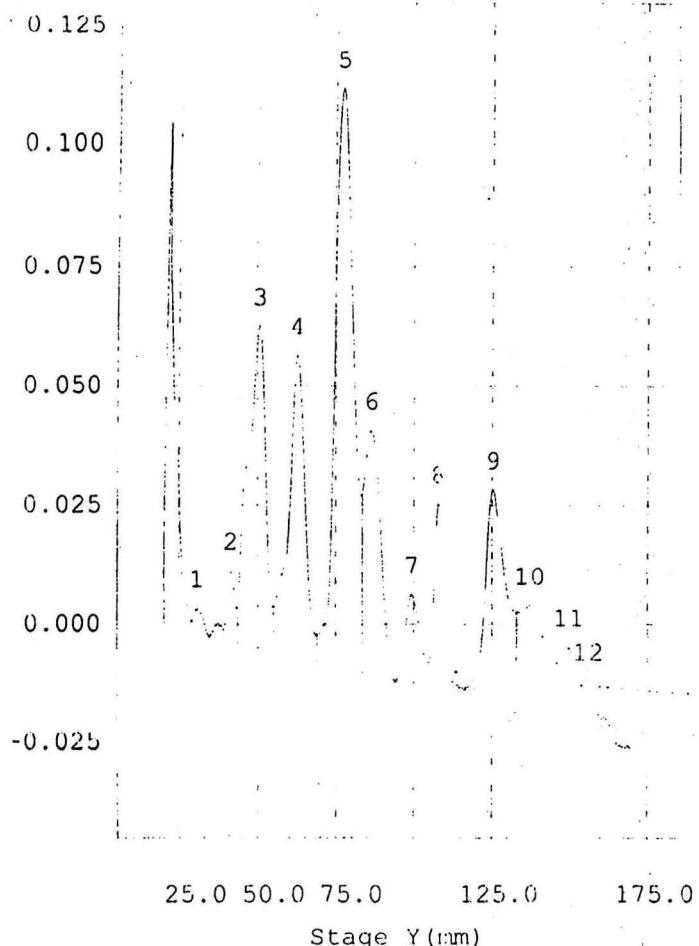
Ketua

(.....)

Lampiran 2.

PROFIL KROMATOGRAFI EKSTRAK DAUN WARU

Waru Fraksi heksan



----- Control parameters
 Photo mode : Reflection
 Lane : Auto
 Zero set mode : At start
 Scan mode : Linear
 Difference : Off
 Lambda : Single
 Trace : Off
 Coordinate parameters
 StartX : 22.8 mm
 StartY : 20.0 mm
 End Y : 170.0 mm
 Wavelength : 365 nm
 ----- Records
 Analyst : ani
 Created date : 03/11/04
 Sample : waru
 Comment : fraksi heksan

NO.	Y (mm)	Area	Mark	%
1	30.66	11.403		0.376
2	41.51	50.125		1.652
3	50.78	436.847	V	14.395
4	62.82	391.104	V	12.887
5	77.29	834.491	V	27.497
6	86.30	310.779	V	10.241
7	99.30	102.683		3.384
8	107.88	125.165	V	4.124
9	125.32	350.662		11.555
10	137.28	241.438	V	7.956
11	149.70	111.138	V	3.662
12	156.00	68.959	V	2.272
Total		3034.794		

*** Analysis parameters ***

--- Comment ---

waru

--- Processing parameters ---

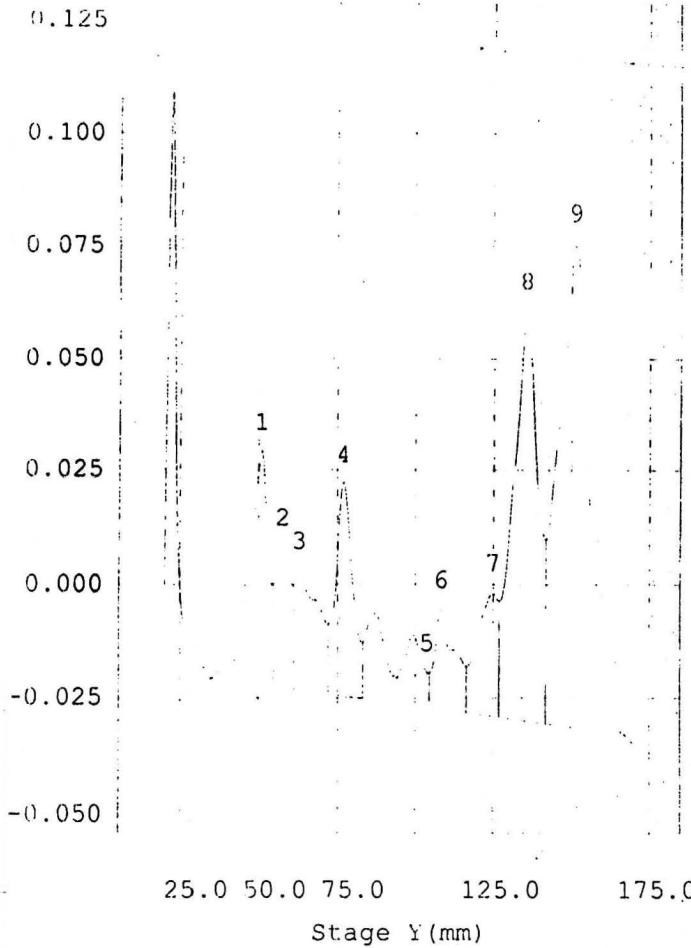
- (1). Width = 5.000
- (2). Slope = 0.012
- (3). Drift = 0.000
- (4). L.Dbl. = 360.000

--- Length program ---

No. (mm) Function

- 1 0.0 WIDTH = 0.000
- 2 4.7 PEAK START
- 3 5.6 PEAK TOP
- 4 7.5 PEAK END
- 5 91.7 PEAK START
- 6 96.2 PEAK TOP
- 7 100.1 PEAK START
- 8 100.1 SLOPE = 0.000
- 9 100.1 WIDTH = 5.000
- 10 100.1 WIDTH = 5.000
- 11 100.7 PEAK START
- 12 108.0 PEAK TOP
- 13 120.0 PEAK END

Waru Fraksi heksan



Control parameters
 Photo mode : Reflection
 Lane : Auto
 Zero set mode : At start
 Scan mode : Linear
 Difference : Off
 Lambda : Single
 Trace : Off
 ---- Coordinate parameters
 StartX : 19.1 mm
 StartY : 20.0 mm
 End Y : 170.0 mm
 Wavelength : 254 nm
 ---- Records
 Analyst : ani
 Created date : 03/11/04
 Sample : waru
 Comment : fraksi heksan

Y (mm)	Area	Mark	%
50.96	371.610		10.442
57.59	171.559	V	4.821
62.82	232.937	V	6.545
76.97	299.773	V	8.423
103.52	44.173		1.241
108.07	168.740	V	4.741
124.97	215.737	V	6.062
135.74	848.373	V	23.839
151.40	1205.931	V	33.886
<hr/>			
total	3558.833		

*** Analysis parameters ***

--- Comment ---

waru

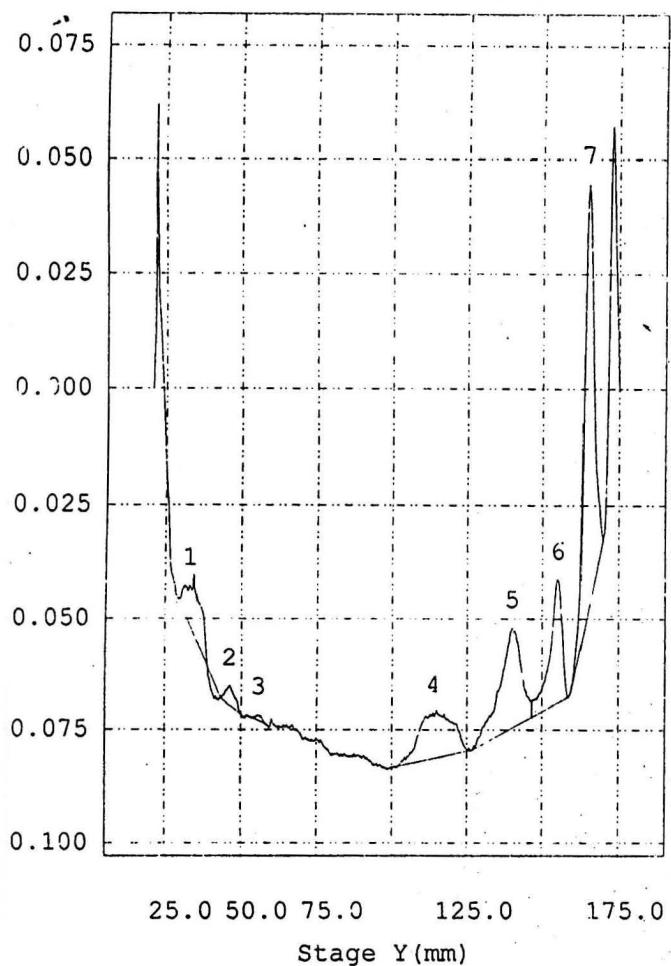
--- Processing parameters ---

- (1) Width = 5.000
- (2) Slope = 0.012
- (3) Drift = 0.000
- (4) Dbl = 360.000

--- Length program ---

- | No. | (mm) | Function |
|-----|-------|---------------|
| 1 | 0.0 | WIDTH = 0.000 |
| 2 | 4.7 | PEAK START |
| 3 | 5.6 | PEAK TOP |
| 4 | 7.5 | PEAK END |
| 5 | 91.7 | PEAK START |
| 6 | 96.2 | PEAK TOP |
| 7 | 100.1 | PEAK START |
| 8 | 100.1 | SLOPE = 0.000 |
| 9 | 100.1 | WIDTH = 5.000 |
| 10 | 100.1 | WIDTH = 5.000 |
| 11 | 100.7 | PEAK START |
| 12 | 108.0 | PEAK TOP |

waru fraksi et. asset



Control parameters

Photo mode : Reflection

Lane : Auto

Zero set mode : At start

Scan mode : Linear

Difference : Off

Lambda : Single

Trace : Off

Coordinate parameters

StartX : 68.2 mm

StartY : 20.6 mm

End Y : 175.0 mm

Wavelength : 254 nm

Stage par

De

Swing

Dual wav

Referenc

Sampl

Bea

Sign

B.C s

Fluoresc.

Data accu

Records

Analyst : ani

Created date : 03/11/07

Sample : waru

Comment : fraksi etil asetat

.. Y(mm) Area Mark %

*** Analysis parameters ***

--- Comment ---

waru

--- Processing parameters ---

(1) Width = 5.000

(2) Slope = 0.012

(3) Drift = 0.000

(4) L.Dbl = 360.000

--- Length program ---

No. (mm) Function

1 0.0 WIDTH = 0.000

2 4.7 PEAK START

3 5.6 PEAK TOP

4 7.5 PEAK END

5 91.7 PEAK START

6 96.2 PEAK TOP

7 100.1 PEAK START

8 100.1 SLOPE = 0.000

9 100.1 WIDTH = 5.000

10 100.1 WIDTH = 5.000

11 100.7 PEAK START

12 108.0 PEAK TOP

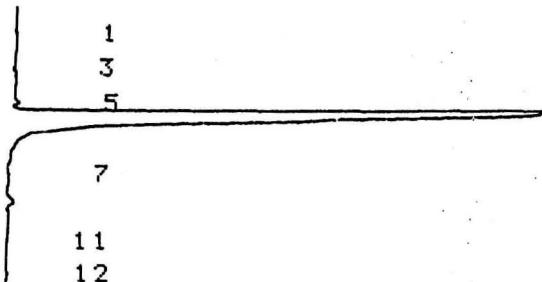
13 120.0 PEAK END

Lampiran 3

PROFIL KROMATOGRAFI EKSTRAK HERBA PEGAGAN

CH. 1 C.S.

5.00 ATT 5 OFFS 0 00/00/00 00:52



STD. Asiaticoside

D-2500

00/00/00 00:52

METHOD: TAG: 4 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

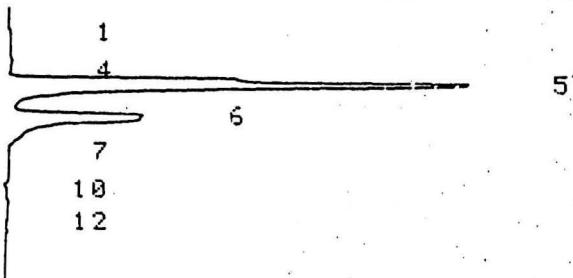
NO.	RT	AREA	CONC	BC
6	3.06	353047	100.000	BB

TOTAL 353047 100.000

PEAK REJ : 3000

sample extract = 60 H
autoran

CH. 1 C.S. 5.00 ATT 5 OFFS 0 00/00/00 01:01



D-2500

00/00/00 01:01

METHOD: TAG: 5 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
5	2.14	256094	73.265	BV
6	3.10	90358	25.850	UV
8	4.82	3093	0.885	TBV

TOTAL 349545 100.000

PEAK REJ : 3000

Lampiran 4

UJI ANTI BAKTERI

PERSIAPAN REAGENSI

- Persiapan reagensia harus dengan cara yang benar, simpan di tempat yang benar untuk jangka waktu tertentu.
- Pastikan timbangan (neraca) dalam posisi yang benar sebelum melakukan penimbangan.
- Bacalah batas bawah dari cekungan (meniscus) jika mengukur suatu larutan.
- Gunakanlah spatula yang bersih untuk mengambil bahan-bahan kimia. Untuk menghindari pencemaran zat-zat kimia, janganlah mencampur zat kimia dari satu botol dengan zat kimia dari botol lainnya.
- Tempelkan etiket pada botol reagensia. Tuliskan nama reagensia dan tanggal pembuatannya.
- Larutan yang berwarna harus disimpan di dalam botol berwarna coklat tua dan selanjutnya disimpan di tempat gelap untuk mencegah pencemaran oleh cahaya.

REAGENSI UNTUK PEMERIKSAAN SEDIAAN HAPUS LANGSUNG (Metode Ziehl-Neelsen)

- 1) Larutan fuchsin-alkohol
 - Fuchsin (Basa) 3 gr
 - Ethanol (95%) 100 ml
 - Larutkan fuchsin (Basa) dalam ethanol dengan sempurna.
- 2) Larutan Phenol 5%
 - Phenol cair* 5 ml
 - Aquades (Air suling) 95 ml
 - Tuangkan phenol cair secara perlahan-lahan ke dalam aquades, sambil diaduk.
 - Panaskan kristal phenol murni dengan hati-hati agar mencair, dan ukurlah (takarlah) dengan menggunakan pipet hangat.
 - Dilarang menghisap phenol dengan mulut.
- 3) Larutan Ziehl (Larutan Fuchsin-phenol)
 - Larutan fuchsin-alkohol 10 ml
 - Larutan phenol 5% 90 ml
 - Campurlah fuchsin-alkohol ke dalam larutan phenol 5% sambil diaduk.
- 4) Alkohol asam (Acid alcohol)
 - Asam hydroklorida (HCl pekat)* 3 ml
 - Ethanol (95%) 97 ml
 - Tuangkan asam hydroklorida (HCl) pekat ke dalam ethanol dengan pipet khusus.
 - Dilarang menghisap asam hydroklorida dengan mulut.
- 5) Larutan Methylene blue 0,1%
 - Methylene blue 0,1 gr
 - Aquades (Air suling) 100 ml
 - Larutkan methylene blue ke dalam aquades.

UNTUK PERSIAPAN MEDIA TELUR (Medium Ogawa)

- 6) Malachite hijau 2%
 - Malachite hijau 2 gr
 - Aquades 100 ml
 - Larutkan malachite hijau ke dalam aquades.

UNTUK PEMERIKSAAN KULTUR (Metoda Ogawa)

- 7) NaOH 4%
 - Sodium hydroxide (NaOH)* 4 gr
 - Aquades 100 ml
 - Larutkan sodium hydroxide ke dalam aquades.
 - Sodium hydroxide dengan mudah dapat menyerap air dari udara, dan menjadi basah. Oleh karena itu, setelah ditimbang, jangan membiarkan larutan tersebut begitu saja di tempat terbuka.

PERSIAPAN UNTUK PENYEDIAAN MEDIA TELUR

- Jagalah semua peralatan dalam keadaan steril, dan jika memungkinkan, jangan banyak orang.
- Peralatan gelas harus dicuci sebersih mungkin untuk menghilangkan adanya benda-benda yang mungkin akan menghambat pertumbuhan basil TBC.
- Semua alat yang dipakai untuk pembuatan pemberian harus disteril dengan autoklav (tangki sterilisasi), atau disterilkan dengan panas oven.

PERALATAN DAN BAHAN

UNTUK PENYEDIAAN LARUTAN GARAM

- Neraca kimiawi
- Spatula dan kertas timbang
- Labu Erlenmeyer 500 ml:
 - Untuk menyiapkan larutan garam
- Cylinder atau gelas ukur 100 ml:
 - Untuk menakar aquades untuk larutan garam
- Penangas air (water bath):
 - Untuk melarutkan larutan garam
- Monopotassium fosfat (KH_2PO_4)
- Sodium glutamat
- Aquades

UNTUK PERSIAPAN/PEMBUATAN LARUTAN TELUR YANG DIKOCOK

- Telur:
 - Telur harus segar. Satu telur menghasilkan 40 – 50 ml kocokan telur.
- Kapas yang direndam dalam spiritus:
 - Untuk membersihkan permukaan kulit telur
- Sumpit (chopsticks):
 - Untuk mengocok telur. (Dapat juga memakai mixer)
- Kain kasa:
 - Untuk menyaring larutan/kocokan telur. (Harus digunakan empat lapis kain kasa steril.)
- Gelas ukur (200 – 250 ml):
 - Untuk mengukur volume larutan telur.
- Gelas kimia (500 ml):
 - Untuk mengocok telur dan membagi ke dalam satu jenis saja.
- Corong:
 - Untuk menyaring larutan telur.
- Cawan petri:
 - Untuk memeriksa kualitas telur.

UNTUK PERSIAPAN/PEMBUATAN PEMBENIHAN TELUR YANG BELUM DIMASAK:

- Pipet (10 ml):
 - Tambahkan glycerol dan malachite hijau 2%. (Hendaknya dipakai pipet yang ujungnya agak lebar, sehingga glycerol yang kental lebih mudah dihisap.)
- Glycerol
- Malachite hijau 2%

UNTUK DISTRIBUSI

- Tabung pembenihan (18 x 180 mm) dengan tutup
- Pipet (10 ml):
 - Untuk membagi media ke dalam tiap tabung.
- Rak tabung

UNTUK MEMASAK DAN MENYIMPAN MEDIA PEMBENIHAN:

- Inspisator:
 - Untuk membekukan pembenihan. (Pasanglah suhu 90°C sebelum dimulai, untuk menyingkat waktu.)
- Kantong plastik:
 - Untuk menyimpan media telur yang telah disiapkan di dalam lemari es.

PERSIAPAN MEDIA TELUR (Media Ogawa)

KOMPOSISI MEDIA OGAWA

Larutan garam

Monopotassium fosfat (KH_2PO_4)	3 g (1 gr*)
Sodium glutamat	1 gr
Aquades	100 ml
Glycerol	6 ml
Malachite hijau 2%	6 ml
Telur yang dikocok	200 ml

MEMBUAT LARUTAN GARAM

Larutkan KH_2PO_4 dan sodium glutamat dalam aquades. Masukkan dalam penangas air (Water bath) untuk dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit. Atau, dapat juga dipanaskan dengan tangki sterilisasi (Autoclaving) pada suhu 121°C selama 15 menit.

PERSIAPAN LARUTAN TELUR YANG DIKOCOK:

- 1) Bersihkan kulit telur dengan cara menyikatnya pakai sabun, kemudian bilaslah dengan air kran yang mengalir. Keringkan di dalam sebuah keranjang.
- 2) Usaplah permukaan kulit telur dengan kapas alkohol, pecahkan telur satu persatu dan tempung di dalam cawan petri untuk memeriksa kualitas telur. Jika telur dalam keadaan sudah tidak baik lagi, busuk atau rusak, buanglah, dan gantilah cawan petri dengan yang baru untuk telur berikutnya.
- 3) Pindahkan telur yang baik pada gelas kimia dan kocoklah dengan sumpit sehingga rata.
- 4) Saringlah larutan telur tadi dengan memakai 2 lembar kain kasa steril, ke dalam gelas ukur yang steril.

MEMBUAT PEMBENIHAN TELUR YANG BELUM DIMASAK:

- 1) Campurkan glycerol dan malachite hijau 2% ke dalam larutan garam seperti yang telah disebut di atas, kemudian dinginkan di suhu ruangan.
- 2) Campurkan dengan perlahan-lahan.
- 3) Tuangkan seluruh larutan telur yang sudah dikocok secara perlahan-lahan melalui dinding labu Erlenmeyer untuk menghindari terbentuknya busa.
- 4) Kocok perlahan-lahan dan biarkan selama 30 menit.

DISPENSASI MEDIA MENTAH UTUH

Tuangkan 6 ml media telur yang sudah dikocok (Mentah) ke dalam dinding tabung untuk menghindari terjadinya busa.

PENGENTALAN

Miringkan tabung-tabung yang berisi media pada rak tabung yang miring, dan kentalkan media di dalam inspirator pada suhu 90°C selama 1 jam.

Permukaan media yang tidak rata, menunjukkan suhu temperatur yang terlalu tinggi pada proses pembekuan. Air kondensat keruh menandakan temperatur terlalu rendah selama pembekuan, atau peremanasan yang terlalu sebentar.

PENYIMPANAN

Setelah pengentalan dalam inspirator, biarkan tabung-tabung itu sampai menjadi dingin. Kemudian, simpanlah tabung-tabung itu di dalam sebuah kantong plastik. Ikat dengan karet gelang dan catatlah tanggal pembuatannya.

Simpanlah tabung yang berisi pembenihan (Media) di lemari es, dalam posisi berdiri sampai digunakan. Media ini dapat disimpan sampai satu bulan.

PEMERIKSAAN KULTUR/ MYCOBACTERIUM SECARA BIAKAN (METODE OGAWA)

PENGOLAHAN BAHAN PEMERIKSAAN

Maksud pengolahan bahan pemeriksaan adalah untuk menghomogenkan sediaan sputum dan untuk membunuh mikroorganisme yang tidak diinginkan selain bakteri tahan asam dalam sediaan sputum. Harus diingat bahwa kuman tahan asam juga dipengaruhi oleh pengolahan basa, koncentrasi terlalu tinggi dan pemberian sodium hydrokside yang terlalu lama dan menghambat pertumbuhan kuman tbc.

CARA PENGOLAHAN SPUTUM

- 1) Tambahkan kurang lebih 4 volume NaOH 4% kedalam sediaan sputum
- 2) Simpanlah tabung-tabung itu dalam inkubator pada suhu 37 C selama 15 menit untuk melarutkan specimen (Bahan pemeriksaan), kemudian keluarkan tabung tersebut dari inkubator
- 3) Di mixer lebih kurang selama 2-5 menit

INOKULASI (Cara Penanaman)

- 1) Masukkan bahan pemeriksaan yang sudah diolah sebanyak 0,1 ml pada dua tabung kultur/ pembiakan yang berisi media Ogawa 3 %
- 2) Bahan inokulasi harus menyebar rata diatas permukaan media dengan menggunakan Ose
- 3) Letakkan tabung-tabung pada rak miring dengan tutup yang dikendorkan
- 4) Simpanlah pembenihan yang sudah ditanami pada inkubator 37 C
- 5) Tutuplah tabung dengan baik ketika permukaan media kering, kemudian lanjutkan inkubasi selama 4-6 minggu

PENGAMATAN

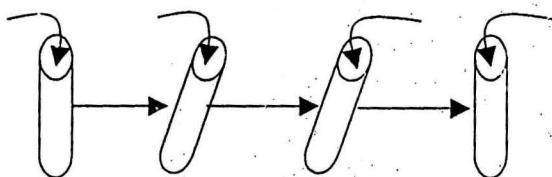
- 1) Amati kultur pada hari ke tujuh untuk golongan yang tumbuhnya cepat, dan pada minggu keempat untuk golongan yang tumbuhnya lambat
- 2) Periksalah koloni yang nampak pada media. Jika terlihat adanya koloni pada setiap pembenihan (Pada hari ke-7 atau pada minggu ke -4) tidak terlihat adanya koloni, lanjutkan inkubasi sampai 8 minggu sebelum hasilnya dinyatakan negatif

PENCATATAN DAN PELAPORAN

- | | |
|------|--|
| (-) | : Tidak ada pertumbuhan |
| (1+) | : 1-200 koloni, catatlah jumlah yang pasti (misal, +12) |
| (2+) | : 1/2 dari media (sediaan) tertutup oleh sebagian 500-2000 koloni. Catatlah jumlah yang pasti, Bila memungkinkan. Misal (+203) |
| (3+) | : 3/4 dari media yang tertutup oleh hampir seluruh Koloni, 500-2000 Koloni |
| (4+) | : Media tertutup seluruhnya oleh koloni sekitar lebih dari 2000 koloni |
| Y | : Kontaminasi |

- I. Percobaan / test dengan slof media L-J dalam tabung komposisi media L-J selektif
Lihat cacabab. Komposisi.cara
- II. Perrcobaan/ test dgn media7H10Agasr dalam Petridis
Inhibitor untuk keduanya: *a.Malachit green0,025g/ cc*
b.Lincomycin 2micro gram/cc

III. Persiapan SuspensiKuman/bakteri:



1 tetes

H2O

Atau Nacl

1 oce gerus +7ml H2O 1mg/ml Suspensi bakteri
penuhi bakteri

Media L-J

Suspensi 1 mg/1 ml NaCl Physiologis diambil dg noce berdiameter 4 mm. Ambil 1 oce penuh

Inokulasipadamedia mengandung obat dan media non obat/Kontrol..

Lihat cara penyiapannmediamengandung obat

INH:0,11 dan 10micro gr/ ml.Rif 40mcg/ml. Strep 1, 10,100.ETB2micg/ml

Untuk Percobaan di Peteidis,media7H10 Agar

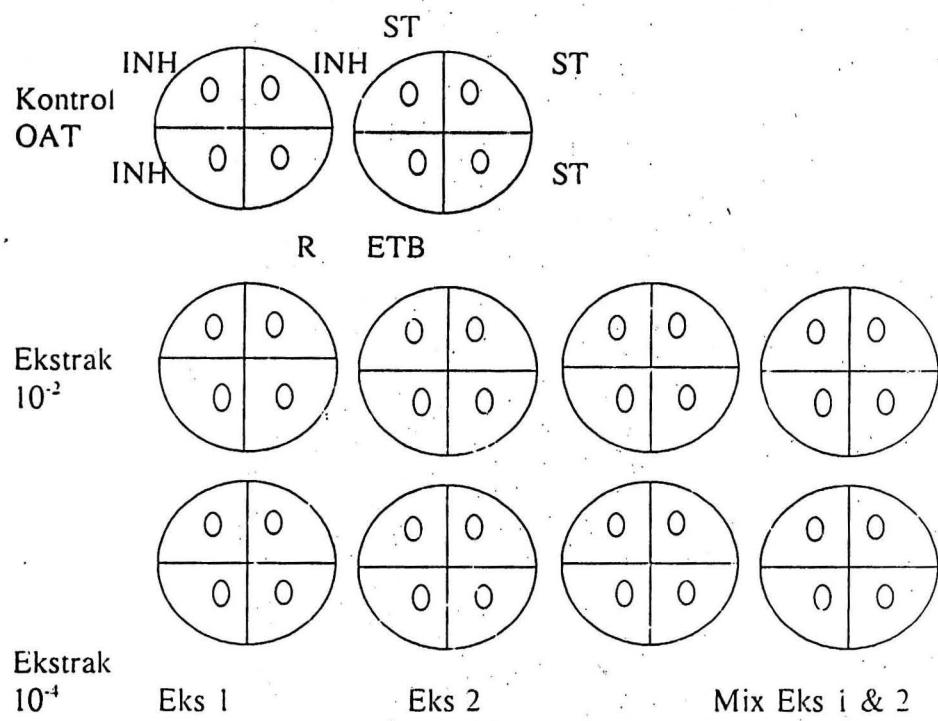
1mg

encerkan

10^{-2} dan 10^{-4}
susensi bakteri Susensi Bakteri

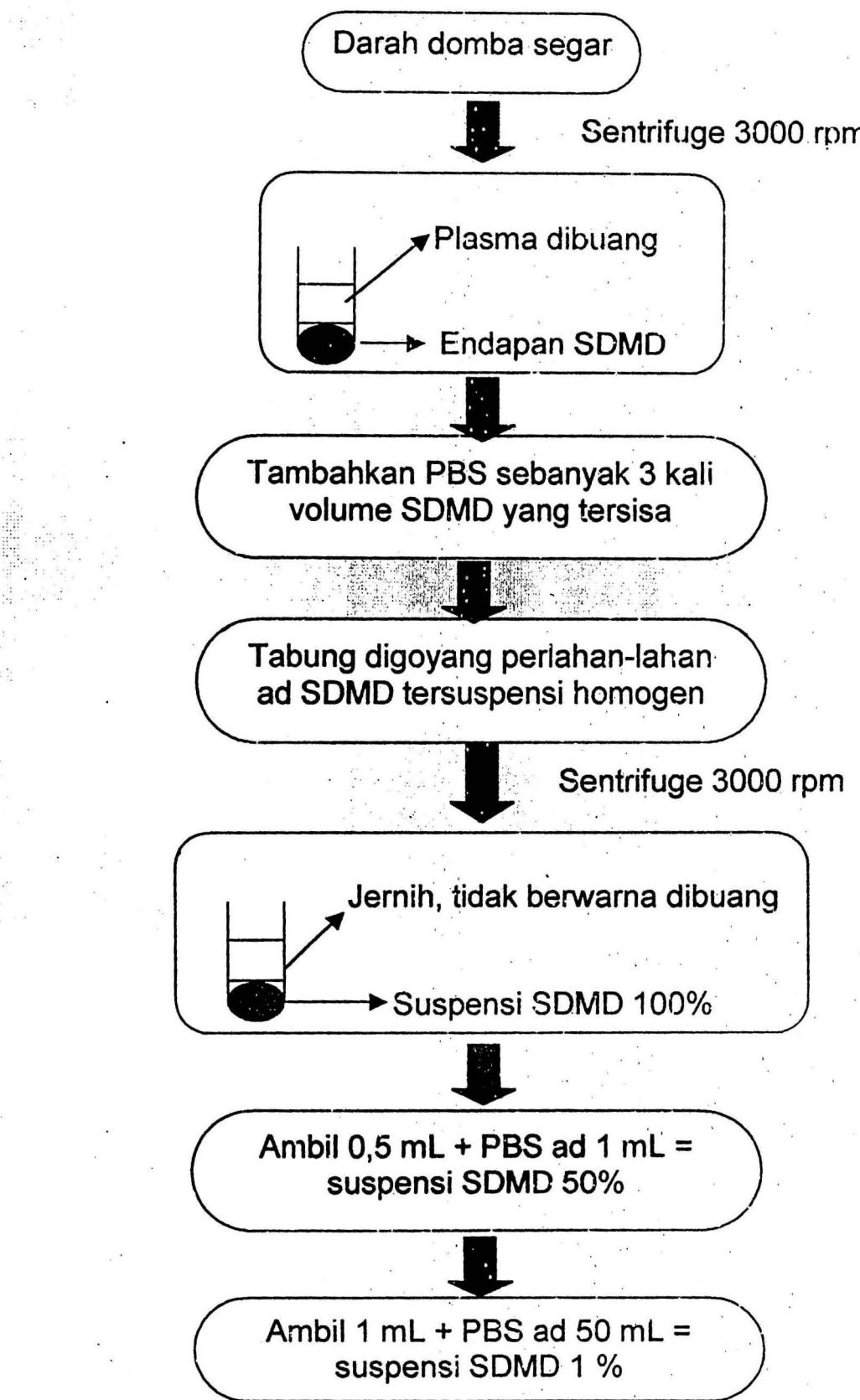
3 drop/pipet /quadran,1 petridis 4 quadran $4 \times 3 = 12$ drop/ petridis
1 petri 15 cc,--- 10petri=150 cc media 7H10 Agar

7 H10 Agar media dalam petridis
+/ mengandung malachite green 2,5 gr/ 100 cc & Lincomycin 2 mcg/ml(200 mcg/100cc).



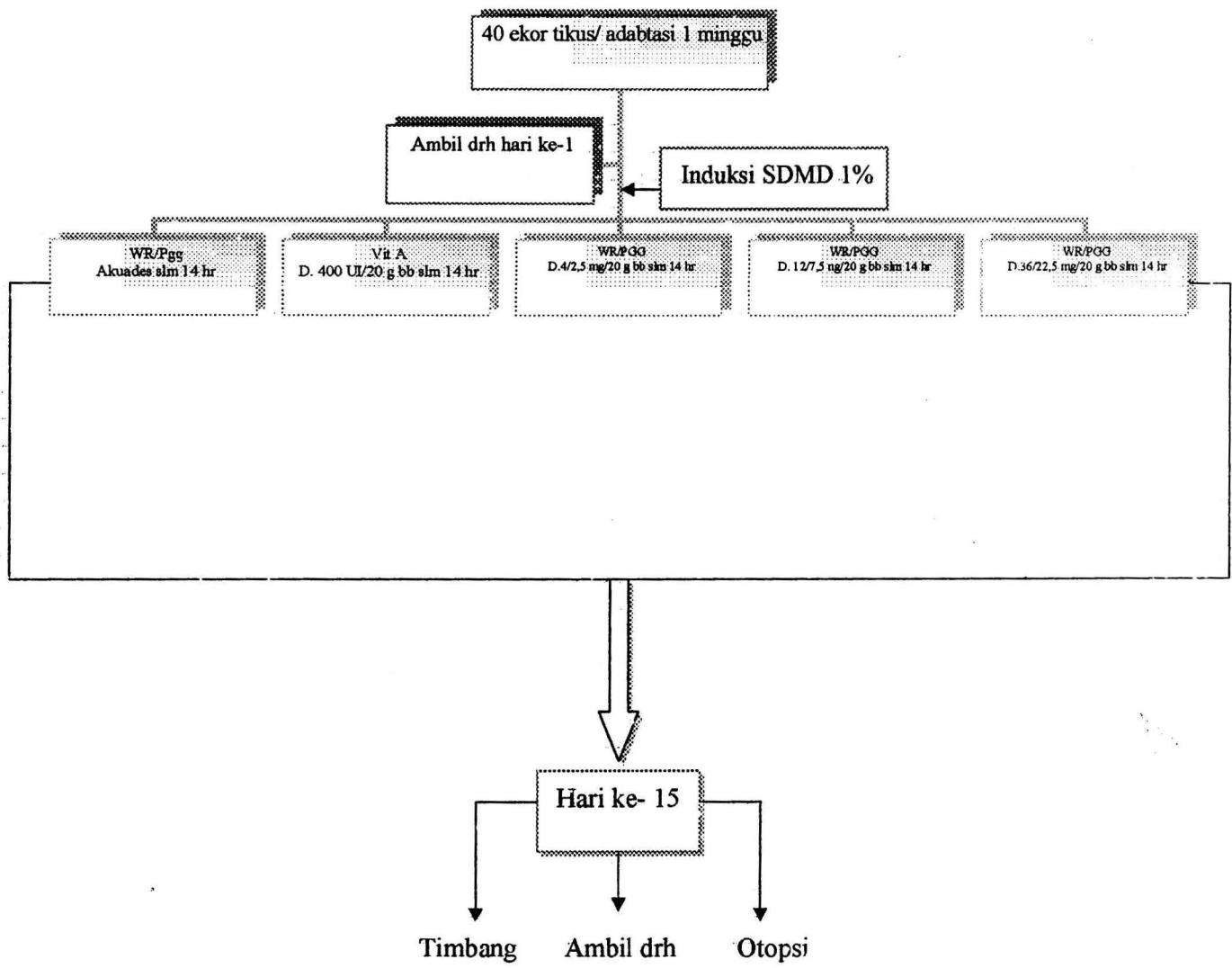
Lampiran 5.

SKEMA PEMBUATAN SUSPENSI SDMD 1%

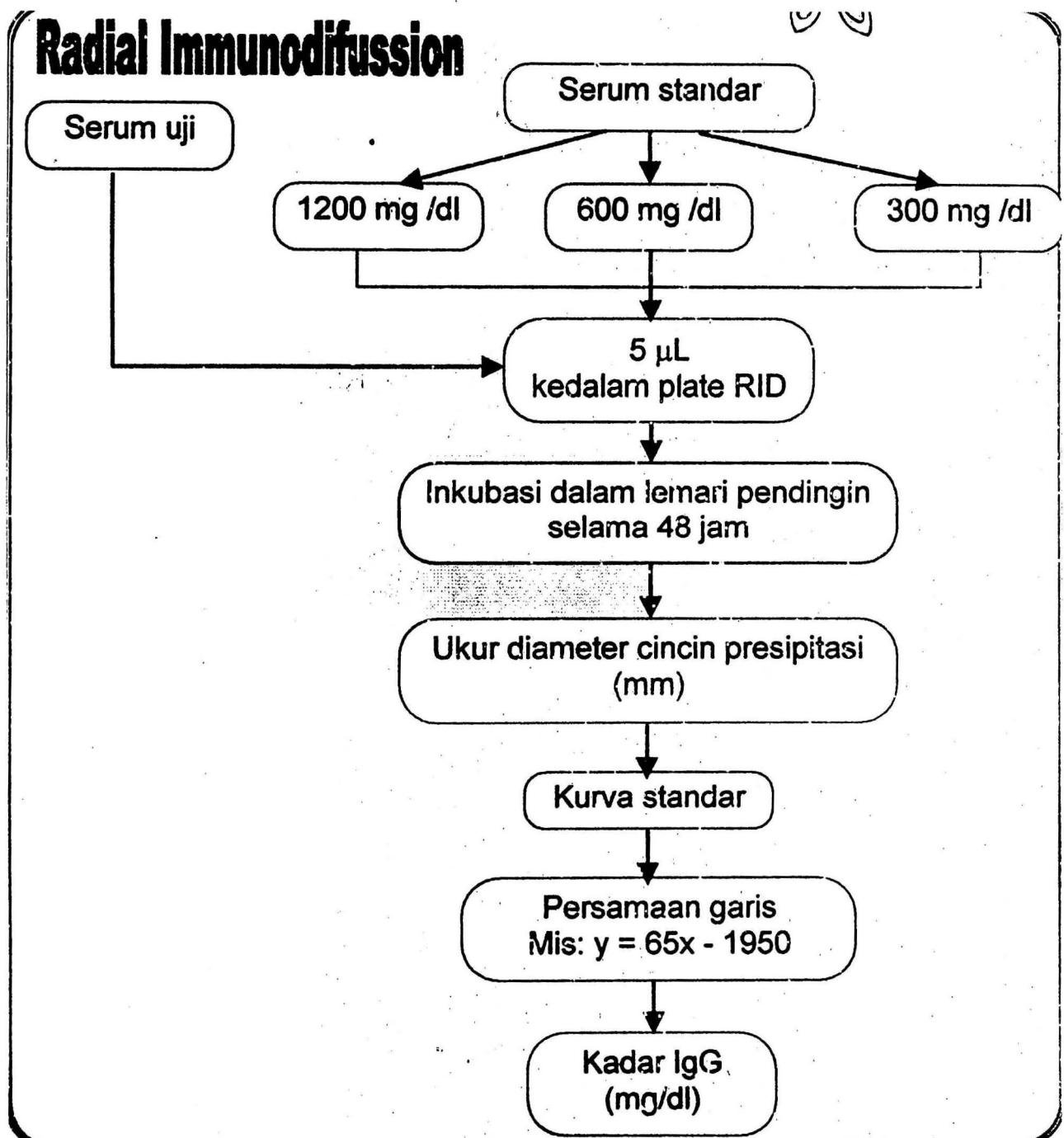


Lampiran 6

SKEMA KERJA IMUNOMODULATOR



SKEMA METODE RADIAL IMMUNODIFFUSION



Lampiran 8

**DATA DAN ANALISA STATISTIK BERAT BADAN MENCIT KELOMPOK
EKSTRAK DAUN WARU**

Perlakuan	N	Rata- rata berat badan (g)		
		Sebelum	Sesudah	Kenaikan
Akuades	1	32.00	37.00	5.00
	2	38.00	40.00	2.00
	3	32.00	37.00	5.00
	4	32.00	36.00	4.00
	5	32.00	37.00	5.00
	6	34.00	39.00	5.00
	7	32.00	38.00	6.00
	8	34.00	38.00	4.00
Vitamin A D. 400 UI/20 g bb	1	30.00	42.00	12.00
	2	30.00	46.00	16.00
	3	30.00	48.00	18.00
	4	29.00	43.00	14.00
	5	30.00	45.00	15.00
	6	30.00	46.00	16.00
	7	30.00	45.00	15.00
	8	30.00	46.00	16.00
Ekstrak daun Waru D. 4 mg/20 g bb	1	30.00	37.00	7.00
	2	32.00	40.00	8.00
	3	32.00	40.00	8.00
	4	28.00	36.00	8.00
	5	28.00	37.00	9.00
	6	32.00	39.00	7.00
	7	28.00	36.00	8.00
	8	28.00	35.00	7.00
Ekstrak daun Waru D. 12 mg/20 g bb	1	32.00	40.00	8.00
	2	28.00	34.00	6.00
	3	30.00	37.00	7.00
	4	26.00	33.00	7.00
	5	30.00	39.00	9.00
	6	30.00	38.00	8.00
	7	26.00	34.00	8.00
	8	30.00	39.00	9.00
Ekstrak daun Waru D. 36 mg/20 g bb	1	30.00	41.00	11.00
	2	32.00	46.00	14.00
	3	34.00	44.00	10.00
	4	30.00	39.00	9.00
	5	30.00	38.00	8.00
	6	34.00	43.00	9.00
	7	30.00	37.00	7.00
	8	30.00	37.00	7.00

Rata- rata dan standar deviasi berat badan kelompok ekstrak daun Waru.

TREAT2		BBAWWR	BBAKWR	SELWR
ak	Mean	33.2500	37.7500	4.5000
	N	8	8	8
vit a	Std. Deviation	2.12132	1.28174	1.19523
	Mean	29.8750	45.1250	15.2500
	N	8	8	8
	Std. Deviation	.35355	1.88509	1.75255
Dosis 4 mg	Mean	29.7500	37.5000	7.7500
	N	8	8	8
	Std. Deviation	1.98206	1.92725	.70711
Dosis 12 mg	Mean	29.0000	36.7500	7.7500
	N	8	8	8
	Std. Deviation	2.13809	2.71241	1.03510
Dosis 36 mg	Mean	31.2500	40.6250	9.3750
	N	8	8	8
	Std. Deviation	1.83225	3.42000	2.32609
Total	Mean	30.6250	39.5500	8.9250
	N	40	40	40
	Std. Deviation	2.29478	3.84274	3.85897

Lampiran 9

DATA DAN ANALISA STATISTIK BERAT BADAN MENCIT
KELOMPOK EKSTRAK HERBA PEGAGAN

Data berat badan mencit selama penelitian

Perlakuan	N	Rata- rata berat badan (g)		
		Sebelum	Sesudah	Kenaikan
Akuades	1	30.00	38.00	8.00
	2	30.00	36.00	6.00
	3	28.00	35.00	7.00
	4	30.00	35.00	5.00
	5	30.00	35.00	5.00
	6	27.00	33.00	6.00
	7	30.00	35.00	5.00
	8	27.00	33.00	6.00
Vitamin A D. 400 UI/20 g bb	1	30.00	42.00	12.00
	2	30.00	46.00	16.00
	3	30.00	48.00	18.00
	4	29.00	43.00	14.00
	5	30.00	45.00	15.00
	6	30.00	46.00	16.00
	7	30.00	45.00	15.00
	8	30.00	46.00	16.00
Ekstrak herba Pegagan D 2,5 mg/20 g bb	1	30.00	39.00	9.00
	2	28.00	40.00	12.00
	3	28.00	39.00	11.00
	4	32.00	40.00	8.00
	5	29.00	38.00	9.00
	6	29.00	38.00	9.00
	7	29.00	38.00	9.00
	8	29.00	38.00	9.00
Ekstrak herba Pegagan D 7,5 mg/20 g bb	1	30.00	38.00	8.00
	2	29.00	39.00	10.00
	3	29.00	39.00	10.00
	4	30.00	40.00	10.00
	5	29.00	38.00	9.00
	6	28.00	38.00	10.00
	7	29.00	38.00	9.00
	8	28.00	38.00	10.00
Ekstrak herba Pegagan D 22,5 mg/20 g bb	1	29.00	42.00	13.00
	2	27.00	43.00	16.00
	3	30.00	45.00	15.00
	4	30.00	44.00	14.00
	5	28.00	45.00	17.00
	6	30.00	42.00	12.00
	7	28.00	45.00	17.00
	8	30.00	42.00	12.00

Analisa statistik berat badan mencit kelompok ekstrak herba Pegagan

Perlakuan		BBAWPGG	BBAKPGG	PRBHPGG
ak	Mean	29.0000	35.0000	6.0000
	N	8	8	8
	Std. Deviation	1.41421	1.60357	1.06904
vit a	Mean	29.8750	45.1250	15.2500
	N	8	8	8
	Std. Deviation	.35355	1.88509	1.75255
dkc	Mean	29.2500	38.7500	9.5000
	N	8	8	8
	Std. Deviation	1.28174	.88641	1.30931
dsd	Mean	29.0000	38.5000	9.5000
	N	8	8	8
	Std. Deviation	.75593	.75593	.75593
dbs	Mean	29.0000	43.5000	14.5000
	N	8	8	8
	Std. Deviation	1.19523	1.41421	2.07020
Total	Mean	29.2250	40.1750	10.9500
	N	40	40	40
	Std. Deviation	1.07387	3.93464	3.76863

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BBAWPGG	Between Groups	4.600	4	1.150	.997	.422
	Within Groups	40.375	35	1.154		
	Total	44.975	39			
BBAKPGG	Between Groups	537.400	4	134.350	70.844	.000
	Within Groups	66.375	35	1.896		
	Total	603.775	39			
PRBHPGG	Between Groups	478.400	4	119.600	55.444	.000
	Within Groups	75.500	35	2.157		
	Total	553.900	39			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
	(I) TREAT2	(J) TREAT2			
BBAWPGG	ak	vit a	-.8750	.53702	.112
		dkc	-.2500	.53702	.644
		dsd	.0000	.53702	1.000
		dbs	.0000	.53702	1.000
vit a	ak		.8750	.53702	.112
		dkc	.6250	.53702	.252
		dsd	.8750	.53702	.112
		dbs	.8750	.53702	.112
dkc	ak		.2500	.53702	.644
		vit a	-.6250	.53702	.252
		dsd	.2500	.53702	.644
		dbs	.2500	.53702	.644
dsd	ak		.0000	.53702	1.000
		vit a	-.8750	.53702	.112
		dkc	-.2500	.53702	.644
		dbs	.0000	.53702	1.000
dbs	ak		.0000	.53702	1.000

BBAKPGG	ak	vit a	-.8750	.53702	.112
		dkc	-.2500	.53702	.644
		dsd	.0000	.53702	1.000
		vit a	-10.1250	.68855	.000
	vit a	dkc	-3.7500	.68855	.000
		dsd	-3.5000	.68855	.000
		dbs	-8.5000	.68855	.000
		ak	10.1250	.68855	.000
	dkc	dkc	6.3750	.68855	.000
		dsd	6.6250	.68855	.000
		dbs	1.6250	.68855	.024
		ak	3.7500	.68855	.000
	dsd	vit a	-6.3750	.68855	.000
		dsd	.2500	.68855	.719
		dbs	-4.7500	.68855	.000
		ak	3.5000	.68855	.000
	dbs	vit a	-6.6250	.68855	.000
		dkc	-.2500	.68855	.719
		dbs	-5.0000	.68855	.000
		ak	8.5000	.68855	.000
	PRBHPPGG	vit a	-1.6250	.68855	.024
		dkc	4.7500	.68855	.000
		dsd	5.0000	.68855	.000
		ak	9.2500	.73436	.000
	vit a	dkc	-3.5000	.73436	.000
		dsd	-3.5000	.73436	.000
		dbs	-8.5000	.73436	.000
		ak	9.2500	.73436	.000
	dkc	dkc	5.7500	.73436	.000
		dsd	5.7500	.73436	.000
		dbs	.7500	.73436	.314
		ak	3.5000	.73436	.000
	dsd	vit a	-5.7500	.73436	.000
		dsd	.0000	.73436	1.000
		dbs	-5.0000	.73436	.000
		ak	3.5000	.73436	.000
	dbs	vit a	-5.7500	.73436	.000
		dkc	.0000	.73436	1.000
		dbs	-5.0000	.73436	.000
		ak	8.5000	.73436	.000
	dkc	vit a	-.7500	.73436	.314
		dsd	5.0000	.73436	.000
		dsd	5.0000	.73436	.000

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 10

DATA DAN ANALISA STATISTIK BERAT LIMPA KELOMPOK EKSTRAK DAUN WARU

Berat rata-rata limpa kelompok ekstrak Waru

Perlakuan	Mean	N	Std. Deviation
Akuades	2.6529	8	.34582
Vit. A	3.0281	8	1.50250
Ekstr. Waru D.4mg/20 g bb	4.3207	8	.99505
Ekstr. Waru D.16mg/20 g bb	3.7293	8	1.35230
Ekstr. Waru D.36mg/20 g bb	3.7423	8	1.48883
Total	3.4947	40	1.29780

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.799	4	3.450	2.327	.075
Within Groups	51.888	35	1.483		
Total	65.687	39			

Lampiran 11

DATA DAN ANALISA STATISTIK BERAT RELATIF LIMPA KELOMPOK EKSTRAK HERBA PEGAGAN

Report

LIMPA1

TREAT2	Mean	N	Std. Deviation
akuades	102.7000	8	5.26552
vit a	137.1500	8	69.76104
Dosis 2,5 mg	167.2000	8	37.59829
Dosis 7,5 mg	143.3875	8	51.99248
Dosis 22,5 mg	163.2750	8	66.81740
Total	142.7425	40	54.43627

ANOVA

LIMPA1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21238.774	4	5309.694	1.970	.121
Within Groups	94330.204	35	2695.149		
Total	115568.978	39			

Lampiran 12

DATA DAN ANALISA KADAR IgG KELOMPOK EKSTRAK DAUN WARU

Perlakuan	N	Rata- rata kadar IgG (mg/dl)		
		Sebelum	Sesudah	Kenaikan
Akuades	1	1024	1052	28.00
	2	934	1010	76.00
	3	1105	1142	37.00
	4	842	900	58.00
	5	941	1011	70.00
	6	940	1040	100.00
	7	1103	1120	17.00
	8	1101	1210	109.00
Vitamin A D. 400 UI/20 g bb	1	1022	1365	343.00
	2	950	1298	348.00
	3	866	1456	590.00
	4	1122	1498	376.00
	5	1105	1365	260.00
	6	866	1298	432.00
	7	1122	1365	243.00
	8	1105	1315	210.00
Ekstrak daun Waru D 4 mg/20 g bb	1	997	1085	88.00
	2	968	1024	56.00
	3	965	1102	137.00
	4	1108	1122	14.00
	5	980	1022	42.00
	6	965	1102	137.00
	7	946	1040	94.00
	8	980	1022	42.00
Ekstrak daun Waru D 12 mg/20 g bb	1	986	1024	38.00
	2	965	1056	91.00
	3	864	1265	401.00
	4	966	1058	92.00
	5	1124	1164	40.00
	6	965	1265	300.00
	7	864	1058	194.00
	8	966	1164	198.00
Ekstrak daun Waru D 36 mg/20 g bb	1	899	1364	465.00
	2	1165	1298	133.00
	3	1000	1402	402.00
	4	1122	1198	76.00
	5	966	1284	318.00
	6	965	1402	437.00
	7	864	1198	334.00
	8	966	1284	318.00

ANOVA
KDR Awal WARU

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19872.354	5	3974.471	.505	.771
Within Groups	330449.62	42	7867.848		
Total	350321.97	47			
	9				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	745835.16	5	149167.03	16.480	.000
Within Groups	380168.75	42	9051.637		
Total	1126003.9	47			
	17				

ANOVA
KDR Akir WARU

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	903755.91	5	180751.18	30.238	.000
Within Groups	251057.75	42	5977.565		
Total	1154813.6	47			
	67				

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PRBWR

LSD

(I) PERLAKWR	(J) PERLAKWR	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	induksi	-35.6250	47.57005	.458	-131.6252	60.3752
	vit A	-324.0000*	47.57005	.000	-420.0002	-227.9998
	waru kcl	-50.0000	47.57005	.299	-146.0002	46.0002
	waru sd	-143.0000*	47.57005	.004	-239.0002	-46.9998
	waru bs	-284.1250*	47.57005	.000	-380.1252	-188.1248
induksi	normal	35.6250	47.57005	.458	-60.3752	131.6252
	vit A	-288.3750*	47.57005	.000	-384.3752	-192.3748
	waru kcl	-14.3750	47.57005	.764	-110.3752	81.6252
	waru sd	-107.3750*	47.57005	.029	-203.3752	-11.3748
	waru bs	-248.5000*	47.57005	.000	-344.5002	-152.4998
vit A	normal	324.0000*	47.57005	.000	227.9998	420.0002
	induksi	288.3750*	47.57005	.000	192.3748	384.3752
	waru kcl	274.0000*	47.57005	.000	177.9998	370.0002
	waru sd	181.0000*	47.57005	.000	84.9998	277.0002
	waru bs	39.8750	47.57005	.407	-56.1252	135.8752
waru kcl	normal	50.0000	47.57005	.299	-46.0002	146.0002
	induksi	14.3750	47.57005	.764	-81.6252	110.3752
	vit A	-274.0000*	47.57005	.000	-370.0002	-177.9998
	waru sd	-93.0000	47.57005	.057	-189.0002	3.0002
	waru bs	-234.1250*	47.57005	.000	-330.1252	-138.1248
waru sd	normal	143.0000*	47.57005	.004	46.9998	239.0002
	induksi	107.3750*	47.57005	.029	11.3748	203.3752
	vit A	-181.0000*	47.57005	.000	-277.0002	-84.9998
	waru kcl	93.0000	47.57005	.057	-3.0002	189.0002
	waru bs	-141.1250*	47.57005	.005	-237.1252	-45.1248
waru bs	normal	284.1250*	47.57005	.000	188.1248	380.1252
	induksi	248.5000*	47.57005	.000	152.4998	344.5002
	vit A	-39.8750	47.57005	.407	-135.8752	56.1252
	waru kcl	234.1250*	47.57005	.000	138.1248	330.1252
	waru sd	141.1250*	47.57005	.005	45.1248	237.1252

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KDRAKWR

LSD

(I) PERLAKWR	(J) PERLAKWR	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	induksi	-70.13	.38.657	.077	-148.14	7.89
	vit A	-379.50*	.38.657	.000	-457.51	-301.49
	waru kcl	-74.38	.38.657	.061	-152.39	3.64
	waru sd	-141.25*	.38.657	.001	-219.26	-63.24
	waru bs	-313.25*	.38.657	.000	-391.26	-235.24
induksi	normal	70.13	.38.657	.077	-7.89	148.14
	vit A	-309.38*	.38.657	.000	-387.39	-231.36
	waru kcl	-4.25	.38.657	.913	-82.26	73.76
	waru sd	-71.13	.38.657	.073	-149.14	6.89
	waru bs	-243.13*	.38.657	.000	-321.14	-165.11
vit A	normal	379.50*	.38.657	.000	301.49	457.51
	induksi	309.38*	.38.657	.000	231.36	387.39
	waru kcl	305.13*	.38.657	.000	227.11	383.14
	waru sd	238.25*	.38.657	.000	160.24	316.26
	waru bs	66.25	.38.657	.094	-11.76	144.26
waru kcl	normal	74.38	.38.657	.061	-3.64	152.39
	induksi	4.25	.38.657	.913	-73.76	82.26
	vit A	-305.13*	.38.657	.000	-383.14	-227.11
	waru sd	-66.88	.38.657	.091	-144.89	11.14
	waru bs	-238.88*	.38.657	.000	-316.89	-160.86
waru sd	normal	141.25*	.38.657	.001	63.24	219.26
	induksi	71.13	.38.657	.073	-6.89	149.14
	vit A	-236.25*	.38.657	.000	-316.26	-160.24
	waru kcl	66.88	.38.657	.091	-11.14	144.89
	waru bs	-172.00*	.38.657	.000	-250.01	-93.99
waru bs	normal	313.25*	.38.657	.000	235.24	391.26
	induksi	243.13*	.38.657	.000	165.11	321.14
	vit A	-66.25	.38.657	.094	-144.26	11.76
	waru kcl	238.88*	.38.657	.000	160.86	316.89
	waru sd	172.00*	.38.657	.000	93.99	250.01

*: The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 13

DATA DAN ANALISA KADAR IgG MENCIT KELOMPOK EKSTRAK HERBA PEGAGAN

Perlakuan	N	Rata- rata kadar IgG (mg/dl)		
		Sebelum	Sesudah	Kenaikan
Akuades	1	1024	1050	56.00
	2	859	934	75.00
	3	1105	1120	65.00
	4	1200	1230	30.00
	5	941	1065	70.00
	6	940	1102	100.00
	7	1103	1109	68.00
	8	1101	1204	73.00
Vitamin A D. 400 UI/20 g bb	1	1022	1365	343.00
	2	954	1298	344.00
	3	866	1456	590.00
	4	1122	1498	376.00
	5	1105	1365	260.00
	6	866	1298	432.00
	7	1122	1365	243.00
	8	1105	1300	195.00
Ekstrak herba Pegagan D 2,5 mg/20 g bb	1	1165	1156	91.00
	2	942	1024	82.00
	3	865	968	103.00
	4	1124	1130	56.00
	5	1054	1102	48.00
	6	942	968	39.00
	7	865	1028	100.00
	8	865	1102	137.00
Ekstrak herba Pegagan D 7,5 mg/20 g bb	1	1122	1156	134.00
	2	1204	1230	176.00
	3	854	968	114.00
	4	924	1026	102.00
	5	964	1102	138.00
	6	854	1158	154.00
	7	924	1179	155.00
	8	964	1180	216.00
Ekstrak herba Pegagan D 22,5 mg/20 g bb	1	1055	1465	410.00
	2	1064	1368	304.00
	3	894	1294	400.00
	4	1155	1365	210.00
	5	1000	1290	290.00
	6	1064	1465	401.00
	7	894	1368	474.00
	8	893	1294	401.00

Rata- rata kadar IgG selama penelitian dan analisa statistik

Pelakuan Kel. Pegagan		Kadar IgG awal	Kadar IgG akhir	Kenaikan kadar IgG
normal	Mean	978.00	1004.50	26.5000
	N	8	8	8
	Std. Deviation	65.194	35.845	7.61577
induksi	Mean	1034.13	1101.75	67.1250
	N	8	8	8
	Std. Deviation	113.425	92.163	19.61368
vit A	Mean	1020.25	1368.13	347.8750
	N	8	8	8
	Std. Deviation	111.515	74.733	124.56947
Pegagan D.2,5	Mean	977.75	1059.75	82.0000
	N	8	8	8
	Std. Deviation	121.279	72.596	32.84596
Pegagan D. 7,5	Mean	976.25	1124.88	148.6250
	N	8	8	8
	Std. Deviation	124.650	87.827	35.97196
Pegagan D. 22,5	Mean	1002.37	1363.63	361.2500
	N	8	8	8
	Std. Deviation	99.368	71.424	85.34091

ANOVA

Kadar IgG awal dan kenaikannya

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IgG awal	Between Groups	24818.000	5	4963.600	.427	.827
	Within Groups	487699.250	42	11611.887		
	Total	512517.250	47			
Kenaikan IgG	Between Groups	860501.354	5	172100.271	40.311	.000
	Within Groups	179313.125	42	4269.360		
	Total	1039814.479	47			

ANOVA

Kadar IgG akhir

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	983861.188	5	196772.238	35.297	.000
Within Groups	234142.625	42	5574.824		
Total	1218003.813	47			

Beda rata-rata IgG sebelum pemberian bahan dan kenaikan sesudah pemberian bahan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IGGAWPG

LSD

(I) TREATPG	(J) TREATPG	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	induksi	-56.13	.53.879	.304	-164.86	52.61
	vit A	-42.25	.53.879	.437	-150.98	66.48
	cent kcl	.25	.53.879	.996	-108.48	108.98
	cent sd	1.75	.53.879	.974	-106.98	110.48
	cent bs	-24.38	.53.879	.653	-133.11	84.36
induksi	normal	56.13	.53.879	.304	-52.61	164.86
	vit A	13.88	.53.879	.798	-94.86	122.61
	cent kcl	56.38	.53.879	.301	-52.36	165.11
	cent sd	57.88	.53.879	.289	-50.86	166.61
	cent bs	31.75	.53.879	.559	-76.98	140.48
vit A	normal	42.25	.53.879	.437	-66.48	150.98
	induksi	-13.88	.53.879	.798	-122.61	94.86
	cent kcl	42.50	.53.879	.435	-66.23	151.23
	cent sd	44.00	.53.879	.419	-64.73	152.73
	cent bs	17.88	.53.879	.742	-90.86	126.61
cent kcl	normal	-.25	.53.879	.996	-108.98	108.48
	induksi	-56.38	.53.879	.301	-165.11	52.36
	vit A	-42.50	.53.879	.435	-151.23	66.23
	cent sd	1.50	.53.879	.978	-107.23	110.23
	cent bs	-24.63	.53.879	.650	-133.36	84.11
cent sd	normal	-1.75	.53.879	.974	-110.48	106.98
	induksi	-57.88	.53.879	.289	-166.61	50.86
	vit A	-44.00	.53.879	.419	-152.73	64.73
	cent kcl	-1.50	.53.879	.978	-110.23	107.23
	cent bs	-26.13	.53.879	.630	-134.86	82.61
cent bs	normal	24.38	.53.879	.653	-84.36	133.11
	induksi	-31.75	.53.879	.559	-140.48	76.98
	vit A	-17.88	.53.879	.742	-126.61	90.86
	cent kcl	24.63	.53.879	.650	-84.11	133.36
	cent sd	26.13	.53.879	.630	-82.61	134.86

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PERUBPGG

LSD

(I) TREATPG	(J) TREATPG	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	induksi	-40.6250	32.67017	.221	-106.5561	25.3061
	vit A	-321.3750*	32.67017	.000	-387.3061	-255.4439
	cent kcl	-55.5000	32.67017	.097	-121.4311	10.4311
	cent sd	-122.1250*	32.67017	.001	-188.0561	-56.1939
	cent bs	-334.7500*	32.67017	.000	-400.6811	-268.8189
induksi	normal	40.6250	32.67017	.221	-25.3061	106.5561
	vit A	-280.7500*	32.67017	.000	-346.6811	-214.8189
	cent kcl	-14.8750	32.67017	.651	-80.8061	51.0561
	cent sd	-81.5000*	32.67017	.017	-147.4311	-15.5689
	cent bs	-294.1250*	32.67017	.000	-360.0561	-228.1939
vit A	normal	321.3750*	32.67017	.000	255.4439	387.3061
	induksi	280.7500*	32.67017	.000	214.8189	346.6811
	cent kcl	265.8750*	32.67017	.000	199.9439	331.8061
	cent sd	199.2500*	32.67017	.000	133.3189	265.1811
	cent bs	-13.3750	32.67017	.684	-79.3061	52.5561
cent kcl	normal	55.5000	32.67017	.097	-10.4311	121.4311
	induksi	14.8750	32.67017	.651	-51.0561	80.8061
	vit A	-265.8750*	32.67017	.000	-331.8061	-199.9439
	cent sd	-66.6250*	32.67017	.048	-132.5561	-.6939
	cent bs	-279.2500*	32.67017	.000	-345.1811	-213.3189
cent sd	normal	122.1250*	32.67017	.001	56.1939	168.0561
	induksi	81.5000*	32.67017	.017	15.5689	147.4311
	vit A	-199.2500*	32.67017	.000	-265.1811	-133.3189
	cent kcl	66.6250*	32.67017	.048	.6939	132.5561
	cent bs	-212.6250*	32.67017	.000	-278.5561	-146.6939
cent bs	normal	334.7500*	32.67017	.000	268.8189	400.6811
	induksi	294.1250*	32.67017	.000	228.1939	360.0561
	vit A	13.3750	32.67017	.684	-52.5561	79.3061
	cent kcl	279.2500*	32.67017	.000	213.3189	345.1811
	cent sd	212.6250*	32.67017	.000	146.6939	278.5561

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar IgG akhir Pegagan

LSD

(I) TREATPG	(J) TREATPG	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	induksi	-97.25*	37.332	.013	-172.59	-21.91
	vit A	-363.63*	37.332	.000	-438.96	-288.29
	cent kcl	-55.25	37.332	.146	-130.59	20.09
	cent sd	-120.38*	37.332	.002	-195.71	-45.04
	cent bs	-359.13*	37.332	.000	-434.46	-283.79
induksi	normal	97.25*	37.332	.013	21.91	172.59
	vit A	-266.38*	37.332	.000	-341.71	-191.04
	cent kcl	42.00	37.332	.267	-33.34	117.34
	cent sd	-23.13	37.332	.539	-98.46	52.21
	cent bs	-261.88*	37.332	.000	-337.21	-186.54
vit A	normal	363.63*	37.332	.000	288.29	438.96
	induksi	266.38*	37.332	.000	191.04	341.71
	cent kcl	308.38*	37.332	.000	233.04	383.71
	cent sd	243.25*	37.332	.000	167.91	318.59
	cent bs	4.50	37.332	.905	-70.84	79.84
cent kcl	normal	55.25	37.332	.146	-20.09	130.59
	induksi	-42.00	37.332	.267	-117.34	33.34
	vit A	-308.38*	37.332	.000	-383.71	-233.04
	cent sd	-65.13	37.332	.088	-140.46	10.21
	cent bs	-303.88*	37.332	.000	-379.21	-228.54
cent sd	normal	120.38*	37.332	.002	45.04	195.71
	induksi	23.13	37.332	.539	-52.21	98.46
	vit A	-243.25*	37.332	.000	-318.59	-167.91
	cent kcl	65.13	37.332	.088	-10.21	140.46
	cent bs	-238.75*	37.332	.000	-314.09	-163.41
cent bs	normal	359.13*	37.332	.000	283.79	434.46
	induksi	261.88*	37.332	.000	186.54	337.21
	vit A	-4.50	37.332	.905	-79.84	70.84
	cent kcl	303.88*	37.332	.000	228.54	379.21
	cent sd	238.75*	37.332	.000	163.41	314.09

*. The mean difference is significant at the .05 level.

