

EFFECT OF 50% ETHANOLIC EXTRACT OF PEGAGAN HERB (*Centella asiatica* (L.) Urban) ON CELL PROLIFERATION OF LYMPHOCYTES IN Balb/c MALE MICE INDUCED BY HEPATITIS B VACCINE

PENGARUH EKSTRAK ETANOLIK 50% HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban) TERHADAP PENINGKATAN PROLIFERASI SEL LIMFOSIT MENCIT JANTAN GALUR Balb/c YANG DIINDUKSI VAKSIN HEPATITIS B

Nikmah Nur Khusnawati, Suwijiyo Pramono, Ediati Sasmito*

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban) has been known as multi effect plant that empirically used in the traditional medicine. This research aims to evaluate the effect of 50%ethanolic extract of pegagan herb against increased lymphocyte proliferation cells in Balb/c mice that induced with hepatitis B vaccine, and also to evaluate triterpen glicosida compound (asiaticosida) of 50% ethanolic extract of pegagan herb. The test was done by 60 Balb/c male mices that divided into 6 groups : control group, testing group that was treated with pegagan extract dose of 25mg/KgBB, 50 mg/KgBB, 100mg/KgBB, 200mg/KgBB and 400mg/KgBB. All of mices were vaccinated on day 0 and days 15. Furthermore, identification of triterpen glicosida compound was done by KLT method using BAW 4:1:5 as upper eluen. Lymphocyte cells were isolated and the cells proliferation measured by MTT reduction method. Data was analyzed statistically using 95% confidence level. The result shown that 50% of ethanolic extract of pegagan herb did not give the immunomodulatory effect while the identification test shown that 50% of extract of pegagan herb has triterpen glicosida compound (asiaticoside).

Keywords: Centella asiatica (L.) Urban, asiaticoside, immunomodulator, lymphocyte cells proliferation

ABSTRAK

Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban) dikenal sebagai tanaman yang memiliki banyak khasiat yang secara empiris digunakan dalam pengobatan tradisional. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanolik 50% herba pegagan terhadap peningkatan proliferasi sel limfosit pada mencit jalur Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B serta untuk mengetahui adanya senyawa glikosida triterpen (asiatikosida) dalam ekstrak etanolik 50% herba pegagan. Sebanyak 60 ekor mencit jantan galur Balb/c dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok uji yang diberi ekstrak pegagan dosis 25mg/KgBB, 50mg/KgBB, 100mg/KgBB, 200mg/KgBB dan 400 mg/KgBB. Hewan uji divaksinasi pada hari ke-0 dan hari ke-15. Sementara identifikasi senyawa glikosida triterpen dilakukan dengan metode KLT dengan fase gerak atas BAW 4:1:5. Sel limfosit diisolasi kemudian proliferasi sel diukur menggunakan metode MTT. Data yang diperoleh dianalisis secara statistika dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik 50% herba pegagan tidak berefek sebagai imunomodulator sedangkan hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak etanolik 50% pegagan mengandung senyawa glikosida triterpen (asiatikosida).

Kata kunci : Centella asiatica (L.) Urban, asiatikosida, imunomodulator, proliferasi sel limfosit

PENDAHULUAN

Obat-obatan tradisional telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat Eropa dan Asia termasuk Indonesia. Peningkatan jumlah konsumsi obat tradisional dan pemakaian bahan kosmetik tradisional serta bahn industri pangan meningkat sejalan dengan kecenderungan

masyarakat untuk kembali ke alam atau *back to nature* (Pitojo, 2002).

Centella asiatica (L.) Urban atau yang dikenal dengan pegagan merupakan salah satu jenis herba yang memiliki manfaat yang sangat luas dan beragam antar lain peluruh air seni, obat sariawan, penurunan panas, penambah nafsu makan dan lain-lain. Berdasarkan penelitian terdahulu diketahui bahwa mencit yang dipejani infusa pegagan menunjukkan respon

Corresponding author : Ediati Sasmito
Email : ediatiasmito@yahoo.com

yang tinggi terhadap antibodi primer dan sekunder (Punturee, dkk., 2005). Ekstrak metanol dengan kandungan asiaticosida sebesar 0,18% dapat menaikkan indeks fagositosis tikus albino secara signifikan serta peningkatan titer antibodi (Jayathirta and Mishra, 2004).

Pegagan mengandung beberapa senyawa aktif diantaranya adalah vallerin, alkaloid, glikosida triterpen. Dari berbagai senyawa tersebut, yang biasa digunakan sebagai senyawa penanda adalah senyawa glikosida triterpen (asiaticosida) (Kimura, dkk., 2001). Asiaticosida memiliki aktivitas terhadap *Basilus lepra* secara *in vitro* tetapi juga dapat menurunkan fertilitas pada mencit betina dan pada dosis yang berlebihan dapat menyebabkan hipoglikemia (Widowati, dkk. 1992).

Penggunaan serta penelitian mengenai pegagan semakin meyakinkan bahwa pegagan merupakan tumbuhan multi khasiat. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pegagan terhadap sistem imun khususnya pada peningkatan proliferasi sel limfosit.

METODOLOGI

Alat dan bahan

Alat yang digunakan yaitu : gelas ukur, timbangan, bejana untuk maserasi, gelas pengaduk, corong, kain flanel, wajan penangas air, kompor listrik, kipas angin, flakon, cawan porselen, bejana kromatografi, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, oven, flakon, lampu UV 254, UV 366, penangas, penyemprot, kapiler berheparin, spuit i.p dan p.o, pinset steril, gunting steril, timbangan, cawan petri, tabung sentrifus, alat *sentrifuge* Sorvall MC 12 V, mikropipet, *lamina air flow* (LAF), hemositometer, inkubator CO₂ (Heraeus), tabung eppendorf, mesin *vortex* (Super Mixer-K), *refrigerated sentrifuge* (Sigma 3K12) *plate 96 well* (Nunc) *blue tip, yellow tip*, ELISA Reader.

Bahan yang digunakan yaitu: ekstrak etanolik 50% herba pegagan, hewan uji berupa mencit jantan galur Balb/c umur 8-12 minggu, vaksin hepatitis B (Engerix-B®), butanol, asam asetat glasial, akuabides, pereaksi semprot vanilinasulfat, pereaksi semprot Liebermann-Burchard (LB), etanol 50%, pembanding (TECA), kloroform, etanol 70%, RPMI-1640 (Sigma), natrium bikarbonat (Sigma), hepes (Sigma), FBS 10% v/v (Gibco), penisilin-streptomisin (Sigma), fungizon 0,5% v/v, amonium klorida, akuabides, MTT (Sigma), larutan SDS 10% dalam HCl 0,01 N.

Jalannya penelitian

Pengumpulan dan identifikasi bahan

Bahan yang digunakan berupa herba pegagan yang diambil dari daerah Girimulyo, Nanggulan, Kulonprogo, Yogyakarta. Bahan kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi UGM.

Pembuatan simplisia

Herba yang didapat disortasi dan dilakukan pencucian dan dikering-anginkan untuk meminimalkan jumlah air yang terkandung di dalam herba tersebut. Herba dikeringkan menggunakan oven dengan pemanasan 60°C lalu dibuat serbuk menggunakan mesin penyerbuk. Pengeringan bertujuan untuk meminimalisir kadar air sehingga simplisia tidak rusak akibat reaksi enzimatik maupun pertumbuhan jamur dan mikroba perusak.

Penyerbukan herba dilakukan untuk memperkecil ukuran simplisia sehingga memperluas permukaan bahan yang bersentuhan dengan penyari sehingga senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan semakin banyak yang terlarut dalam larutan penyari.

Pembuatan ekstrak herba pegagan

Sebanyak 1,2 kg serbuk herba pegagan dibuat ekstrak dengan metode maserasi dalam 6 L etanol 50%. Metode maserasi dipilih karena senyawa aktif yaitu glikosida triterpen yang berada dalam bentuk glikosida saponin tidak tahan terhadap pemanasan. Maserasi dilakukan pada tempat yang terlindung dari cahaya untuk mengurangi intensitas cahaya dan sinar matahari termasuk sinar UV sehingga terjadinya reaksi karena cahaya dapat dicegah.

Pemilihan etanol 50% didasarkan bahwa senyawa golongan saponin hanya dapat larut dalam air dan etanol (Robinson, 1995). Perbandingan serbuk dengan pelarut yaitu 1:5 agar lebih efisien.

Maserat yang didapat selanjutnya dipekatkan dengan sedikit pemanasan dan penurunan tekanan untuk mendapatkan ekstrak yang lebih kental serta tidak mengandung etanol. Rendemen ekstrak kental yang didapat yaitu 5,45%.

Perlakuan hewan uji

Sebanyak 60 ekor mencit jantan galur Balb/c umur 8-12 minggu dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing 10 ekor. Larutan uji yang telah dibuat diberikan selama 7 hari untuk pengkondisian dan dilanjutkan selama 28 hari, secara per oral. Ekstrak yang dipejatkan dibedakan menjadi 5 dosis berbeda. Sebagai

kontrol yaitu hewan uji yang hanya diberi akuades.

Kelompok perlakuan adalah sebagai berikut: Kelompok 1 : sebagai kontrol, diberi akuades dan dilakukan vaksinasi; Kelompok 2 : diberi ekstrak etanolik 50% herba pegagan dosis 25 mg/KgBB; Kelompok 3: diberi ekstrak etanolik 50% herba pegagan dosis 50 mg/KgBB; Kelompok 4 : diberi ekstrak etanolik 50% herba pegagan dosis 100 mg/KgBB; Kelompok 5 : diberi ekstrak etanolik 50% herba pegagan dosis 200 mg/KgBB; Kelompok 6 : diberi ekstrak etanolik 50% herba pegagan dosis 400mg/KgBB

Pemberian vaksin dilakukan secara intraperitoneal sebanyak 2 kali yaitu pada hari ke-0 (setelah 7 hari pengkondisian) dan hari ke-15. Volume vaksin yang diberikan dihitung berdasarkan dosis pada manusia yang dikonversikan untuk dosis mencit yaitu sebesar 2,6 $\mu\text{L}/20$ g BB. Karena volume tersebut terlalu kecil, maka dilakukan pengenceran vaksin menggunakan akuabides hingga volume 125 μL .

Isolasi limfosit

Isolasi limfosit dilakukan pada hari ke-19, 4 hari setelah pemberian vaksin kedua. Mencit dikorbankan dengan cara inhalasi menggunakan kloroform lalu kulit bagian perut dibuka. Limpa diambil dan diletakkan dalam cawan petri yang berisi medium RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute*). Limpa diekstruksi sehingga didapatkan suspensi selnya.

Suspensi sel dimasukkan dalam konikel dan didiamkan selama 1 jam lalu disentrifugasi pada 4000rpm, 4°C selama 3 menit untuk diambil peletnya. Pelet yang didapat disuspensikan dalam 5mL bufer tris amonium klorida. Sel dicampur menggunakan pipet dan didiamkan selama 2 menit. Tambahkan 1mL FBS kemudian disentrifugasi pada 4°C selama 3 menit. Pelet yang didapat dicuci dengan RPMI sebanyak 2 kali dan disentrifugasi kembali pada 1200 rpm, 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan sel limfosit disuspensikan dalam medium komplit . Sel dihitung menggunakan hemositometer dan diresuspensikan lagi dengan medium RPMI komplit sehingga diperoleh suspensi sel dengan kepadatan $1,5 \times 10^6/\text{mL}$.

Uji proliferasi sel limfosit dengan metode MTT reduction

Sebanyak 100 μL suspensi sel dimasukkan ke dalam tiap sumuran pada 96-*multiwell plate* dengan penambahan 40 μL antigen (vaksin) pada tiap sumuran. *Plate* pertama diinkubasi pada inkubator CO_2 , pada suhu 37° selama 24 jam sedangkan *plate* kedua diinkubasi selama 48 jam.

Setelah diinkubasi ditambahkan 10 μL larutan 5mg/mL MTT dalam PBS steril, diinkubasi kembali selama 4 jam. Setelah itu, ditambahkan 100 μL *stop solution* (larutan 10% SDS dalam asam klorida 0,01N). Inkubasi dilanjutkan selama *overnight* kemudian dibaca dengan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Identifikasi senyawa aktif (asiatikosida)

Ekstrak pekat herba pegagan dimasukkan ke dalam flakon, ditambah etanol 50% sambil diaduk hingga ekstrak bisa ditotolkan menggunakan kapiler.

Identifikasi senyawa aktif asiatikosida menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika GF 254 dan fase gerak BAW (4:1:5). Plat KLT kemudian disemprot dengan pereaksi vanilin-asam sulfat untuk deteksi umum serta pereaksi LB untuk deteksi senyawa spesifik. Plat KLT lalu diamati pada sinar tampak, sinar UV 254nm dan UV 366nm.

Analisis data

Analisis data dilakukan secara statistik dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang terdistribusi normal dan homogen, diuji dengan uji ANOVA dan Post test-Tukey test. Data yang tidak terdistribusi normal atau tidak homogen dilakukan uji non parametrik dengan uji Kruskal-Wallis dan uji Mann-Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil identifikasi di laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada terhadap herba yang didapatkan dari Girimulyo, Nanggulan, Kabupaten Kulonprogo, menyatakan bahwa herba tersebut adalah benar herba pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban).

Mencit digunakan sebagai hewan uji karena mudah didapat, mudah dalam pemeliharaan. Galur Balb/c dipilih karena lebih sensitif terhadap rangsangan antigen dan digunakan mencit jantan karena hormon yang berpengaruh lebih sedikit daripada mencit betina. Selain itu, dipilih umur 8-12 minggu karena merupakan umur produktif mencit.

Mencit yang sudah dikondisikan selama 7 hari kemudian diberi vaksin hepatitis B. Pemberian vaksin dilakukan untuk merangsang respon imun sehingga sel limfosit akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel limfosit yang mampu menghasilkan antibodi. Pemberian vaksin pertama akan tercapai kadar tertinggi IgM sedangkan vaksinasi kedua, kadar yang meningkat paling tinggi adalah IgG. Setelah pemberian vaksin pertama, akan muncul respon imun primer, kemudian pemberian vaksin kedua

akan muncul respon imun sekunder. Pada saat inilah muncit dikorbankan untuk diambil limpanya.

Proliferasi sel limfosit

Sel limfosit yang digunakan berasal dari organ limpa. Limpa merupakan organ limfoid sekunder utama yang berfungsi sebagai produsen sel limfosit T dan B. Sel limfosit dikultur dalam media RPMI komplet. Media tersebut mengandung asam amino, vitamin dan garam-garam organik. Suspensi sel, limfosit dipropagasi dalam media RPMI komplet dan dilakukan penambahan antigen (vaksin hepatitis B) untuk mengenal kembali sel memori yang telah terbentuk selama perlakuan.

Secara mikroskopis, sel limfosit tampak bulat dan bergerombol dengan inti berukuran kecil. Sel limfosit yang terlihat kemungkinan adalah campuran sel T dan sel B, tetapi keduanya tidak dapat dibedakan secara visual karena memiliki morfologi yang sama.

Proliferasi sel limfosit diukur menggunakan metode MTT *reduction*. Metode ini menggunakan senyawa tetrazolium (MTT) untuk mengukur proliferasi sel. Metode ini sederhana, ekonomis, cepat, aman serta tidak menghasilkan limbah yang berbahaya (Mosmann, 1983). Metode ini menentukan kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolium bromida) (MTT) yang berwarna kuning dan selanjutnya membentuk kristal formazan yang berwarna ungu. Garam tetrazolium dari MTT dapat tereduksi karena adanya aktivitas enzim mitokondrial dehidrogenase (Berridge *et al.*, 1996).

Kristal formazan yang terbentuk dapat diukur pada rentang panjang gelombang 500-600 nm. Pada penelitian ini, digunakan panjang gelombang 550 nm. Absorbansi yang terukur dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD) Jumlah kristal formazan yang terbentuk berkorelasi dengan jumlah sel yang hidup dalam kultur (Anonim, 2005).

Berdasarkan data yang diperoleh, kelompok kontrol, baik yang diinkubasi selama 24 jam maupun 48 jam memiliki OD tertinggi dibandingkan kelompok perlakuan. Sedangkan pada kelompok perlakuan, nilai OD pada kelompok yang diinkubasi selama 48 jam lebih rendah daripada kelompok yang diinkubasi selama 24 jam.

Data yang diperoleh dalam penelitian ini terdistribusi normal dan homogen sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Analisis data yang dilakukan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dengan

ekstrak pegagan dosis 25, 50, 100, 200 dan 400mg/KgBB.

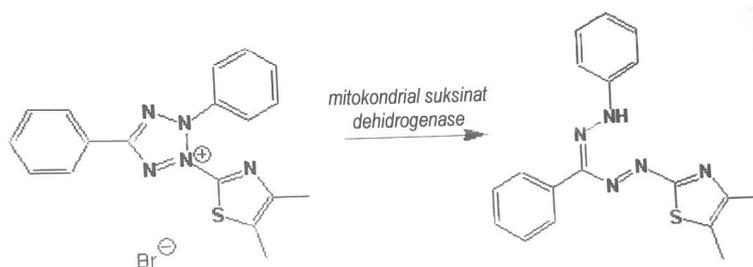
Ekstrak etanol 50% herba pegagan tidak berpotensi sebagai imunomodulator baik imunostimulan maupun immunosupresan karena tidak mampu meningkatkan maupun menurunkan proliferasi sel limfosit. Hal ini mungkin dikarenakan waktu isolasi tidak tepat, yaitu pada hari ke-19. Kemungkinan pada saat itu, sel limfosit sedang berproliferasi akibat paparan antigen pada vaksinasi kedua yang menghasilkan respon imun sekunder, sehingga penambahan antigen pada *plate* uji kemungkinan tidak berpengaruh pada sel memori yang telah terpapar antigen saat perlakuan. Sehingga sebaiknya dilakukan isolasi sel limfosit pada hari ketiga setelah vaksinasi kedua.

Penelitian yang dilakukan oleh Punturee dkk (2005) menyatakan bahwa infus pegagan secara signifikan meningkatkan proliferasi sel limfosit dan produksi IL-2 dan TNF-alpha yang berlawanan dengan ekstrak etanol yang menghambat mitogenesis PBMC dan produksi IL-2 serta TNF-alpha. Penelitian Jayathirta dan Mishra (2004) menunjukkan bahwa ekstrak metanol pegagan dosis 100-500mg/KgBB meningkatkan indeks fagositosis dan sel darah putih. Pada penelitian ini, ekstrak etanol 50% herba pegagan tidak berpengaruh terhadap proliferasi limfosit. Oleh karena itu, kemungkinan ekstrak pegagan lebih berefek pada sistem imun nonspesifik.

Herba pegagan memiliki beberapa senyawa aktif yang belum semuanya diketahui khasiatnya. Beberapa literatur menyatakan bahwa flavonoid dapat berefek sebagai imunostimulator. Herba pegagan juga memiliki kandungan flavonoid, sehingga kemungkinan yang berefek sebagai imunomodulator bukan glikosida triterpen, tetapi senyawa flavonoidnya. Hal ini juga dapat menjadi penyebab ekstrak etanol 50% herba pegagan yang mengandung glikosida triterpen ini tidak berefek signifikan terhadap proliferasi limfosit.

Identifikasi senyawa aktif (asiatikosida)

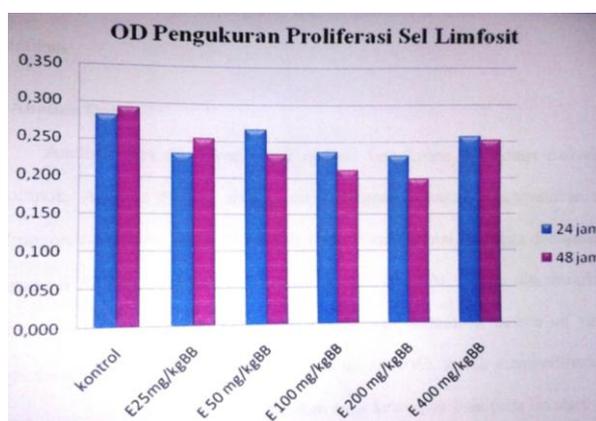
Identifikasi senyawa asiatikosida menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel 60 F254 dan fase gerak atas BAW (butanol : asam asetat : air) dengan perbandingan 4:1:5. Asiatikosida merupakan senyawa golongan saponin berupa glikosida triterpen yang cenderung bersifat semipolar. Fase gerak yang dipilih juga bersifat semipolar sehingga sesuai untuk mengadsorpsi senyawa yang akan diidentifikasi. Pembanding yang digunakan yaitu TECA (*titrated extract Centella asiatica*) yang mengandung asiatikosida sebanyak 41,4% serta asam asiatikat dan asam madekasat sebanyak 58,5%.



Gambar 1. Pembentukan kristal formazan (Anonim, 2008). Garam tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolium bromida) (MTT) yang berwarna kuning tereduksi menjadi kristal formazan yang berwarna ungu karena aktivitas enzim mitokondrial suksinat dehidrogenase.

Tabel I. Hasil rata-rata ± SD pengukuran OD proliferasi sel limfosit pada masing-masing perlakuan

Inkubasi	Kelompok	1	2	3	4	5	6	Rata-rata±SD
24 Jam	Kontrol	0,214	0,224	0,189	0,183	0,661	0,228	0,283±0,186 ^a
	E25 mg/KgBB	0,186	0,138	0,313	0,378	0,131	0,244	0,232±0,091 ^a
	E50 mg/KgBB	0,319	0,228	0,321	0,155	0,319	0,253	0,266±0,067 ^a
	E100 mg/KgBB	0,318	0,367	0,099	0,285	0,189	0,156	0,236±0,104 ^a
	E200 mg/KgBB	0,169	0,297	0,331	0,157	0,224	0,201	0,230±0,070 ^a
	E400 mg/KgBB	0,277	0,381	0,258	0,216	0,167	0,235	0,256±0,072 ^a
48 Jam	Kontrol	0,752	0,252	0,207	0,174	0,157	0,215	0,293±0,227 ^a
	E25 mg/KgBB	0,209	0,177	0,295	0,392	0,189	0,260	0,254±0,081 ^a
	E50 mg/KgBB	0,281	0,217	0,270	0,149	0,280	0,195	0,232±0,054 ^a
	E100 mg/KgBB	0,302	0,289	0,125	0,191	0,192	0,164	0,211±0,070 ^a
	E200 mg/KgBB	0,177	0,268	0,218	0,157	0,198	0,172	0,198±0,040 ^a
	E400 mg/KgBB	0,269	0,413	0,206	0,202	0,200	0,127	0,251±0,083 ^a

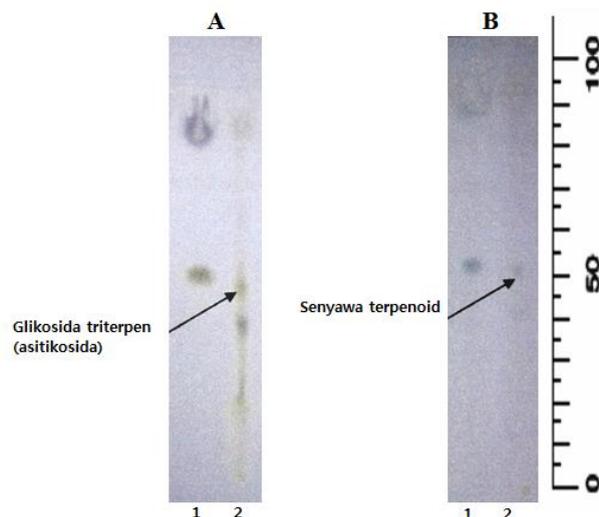


Gambar 2. Grafik OD pengukuran proliferasi limfosit, Pengaruh pemberian ekstrak etanolik 50% herba pegagan terhadap proliferasi limfosit dibandingkan dengan kontrol. Dari grafik terlihat bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Setelah terelusi, lempeng KLT kemudian dikeringanginkan untuk mempermudah pembacaan bercak. Pengamatan dilakukan dengan sinar tampak, UV 254, UV 366 dan pereaksi semprot vanilin asam sulfat. Bercak tampak dengan jelas setelah disemprot dengan pereaksi vanilin asam sulfat kemudian dipanaskan,

Pemanasan ini bertujuan untuk mempercepat reaksi antara senyawa dengan pereaksi semprot sehingga bercak-bercak dapat terlihat lebih jelas.

Berdasarkan hasil identifikasi dengan KLT, bercak yang diduga kuat sebagai terpenoid adalah bercak berwarna kuning dengan hRf 53 yang juga



Gambar 3. Hasil identifikasi senyawa asiatikosida menggunakan KLT dengan pereaksi vanilin asam sulfat (A) dan pereaksi LB (B). Terlihat bercak ekstrak pegagan (1) dan bercak dari pembanding TECA (*tritated extract Centella asiatica*) sebagai standar (2).

muncul pada totalan pembanding. Sedangkan bercak-bercak yang lain adalah senyawa-senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak etanolik 50% herba pegagan.

Berikut ini merupakan hasil identifikasi menggunakan KLT

Deteksi menggunakan pereaksi semprot LB untuk mendeteksi glikosida triterpen dimana akan muncul bercak berwarna hijau-biru. Pada deteksi ini, bercak hijau-biru tersebut tampak jelas setelah disemprot dengan pereaksi LB kemudian dipanaskan. Bercak tampak pada hRf 52 yang juga muncul pada pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam ekstrak pegagan terdapat senyawa asiatikosida.

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik 50% herba pegagan tidak dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Namun hasil identifikasi senyawa aktif di dalam ekstrak etanolik 50% herba pegagan diketahui mengandung senyawa asiatikosida.

DAFTAR PUSTAKA

Berridge M.V., Tan A.S., McCoy K.D., Wang A.R. 1996, *The Biochemical and Cellular Basic of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts*, *Biochemica*, **4** : 14-19
Jayathirtha MG., Mishra SH. 2004, Preliminary Immunomodulatory Activities of Methanol

Extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*, *Phytomedicine*, **11**, 361-365.

Kimura Y., Sumiyoshi M., Samukawa K., Satake N., Sakanaka M. 2008, Facilitating Action of Asiaticoside at Low Dose on Wound Burn Repair and Its Mechanism, *European Journal of Pharmacology*, **584**, 415-423.

Mosmann T., 1983, Rapid Colorimetric Assays for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, **16** (65) : 55-63.

Pitojo S., 2002, *Ceplukan Herba Berkhasiat Obat*, Kanisius, Yogyakarta.

Punturee K., Wild C.P., Kasinrerck W., Vinitketkumnuen U. 2005, Immunomodulatory Activities of *Centella asiatica* and *Rhinacanthus nasutus* extracts, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **6**, 396-400.

Robinson T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Edisi VI, 156-157, Penerbit ITB, Bandung.

Widowati L., Pudjiastuti, Indrari, Sundari D. 1992, Beberapa Informasi Khasiat Keamanan dan Fitokimia Tanaman Pegagan, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, Jakarta.