

**PERUBAHAN KUANTITATIF SEL T KILLER CD8⁺ PADA
MENCIT BALB/c (*Mus musculus*) SETELAH PEMBERIAN
CRUDE EKSTRAK UMBI SARANG SEMUT (*Hydnophytum
formicarum* Jack.)**

SKRIPSI

oleh:
NINING SETIAWATI
0810910059-91



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

**PERUBAHAN KUANTITATIF SEL T KILLER CD8⁺ PADA
MENCIT BALB/c (*Mus musculus*) SETELAH PEMBERIAN
CRUDE EKSTRAK UMBI SARANG SEMUT (*Hydnophytum
formicarum* Jack.)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam bidang Biologi

oleh:
NINING SETIAWATI
0810910059-91



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Perubahan Kuantitatif Sel T Killer CD8⁺ pada Mencit BALB/c
(*Mus musculus*) Setelah Pemberian *Crude* Ekstrak Umbi Sarang
Semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.)**

oleh :
NINING SETIAWATI
0810910059-91

**Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada Tanggal 13 Juli 2012
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

Disetujui oleh :

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Muhaimin R., PhD, Med.SC
NIP. 19680626-199702-1

Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS
NIP. 19610304-1999403-1

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Widodo, S.Si, Ph.D, Med.Sc
NIP. 1970811-200003-1

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nining Setiawati

NIM : 0810910059-91

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi Berjudul :

Perubahan Kuantitatif Sel T Killer CD8 Pada Mencit Balb/C (*Mus Musculus*) Setelah Pemberian Crude Ekstrak Umbi Sarang Semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Skripsi ini. Karya-karya yang tercantum dalam daftar puataka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/ referensi
2. Apabila di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran

Malang, 13 Juli 2012

Yang menyatakan

Nining Setiawati

0810910059-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Perubahan Kuantitatif Sel T Killer CD8⁺ pada Mencit BALB/c (*Mus musculus*) Setelah Pemberian *Crude* Ekstrak Umbi Sarang Semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.)

**Nining, S., Muhaimin Rifa'i, M. Sasmito Djati
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang.**

ABSTRAK

Tanaman Sarang Semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) mengandung berbagai senyawa aktif yang diduga dapat berperan sebagai imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan kuantitatif sel T CD8⁺CD62L⁺ pada organ *spleen* dan sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ pada organ *spleen* dan timus selain itu untuk mengetahui histopatologis hepar pada mencit BALB/c sehat setelah pemberian *crude* ekstrak umbi tanaman sarang semut secara oral. Hewan coba (*Mus musculus*) diberi perlakuan secara oral dengan umbi sarang semut selama 14 hari pada pagi dan sore hari. Selanjutnya, isolasi dilakukan pada organ *spleen* dan timus. Analisis kuantitatif jumlah relatif sel T CD8⁺CD62L⁺ pada *spleen* serta sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada *spleen* dan timus dilakukan dengan menggunakan *Flowcytometry*. Histopatologi hepar diamati melalui preparat histologi organ hepar dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Data dianalisis menggunakan RAL faktorial (*One-way two factor*) pada program SPSS 16.0 for Windows. *Crude* ekstrak umbi sarang semut tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perubahan kuantitatif jumlah relatif sel T CD8⁺CD62L⁺ pada *spleen*. Berdasarkan, interaksi antara dosis dan organ (*spleen* dan timus) pada setiap perlakuan, *crude* ekstrak sarang semut tidak memberikan pengaruh secara signifikan pada jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Histopatologi pada organ hepar pada setiap perlakuan menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada sel hepatosit.

Kata kunci : histopatologi, *Hydnophytum formicarum* Jack., imunomodulator, sel T CD8⁺

The Quantitative Alteration of CD8⁺ T Cell Killer In BALB/c Mice (*Mus musculus*) After Giving Ant Plant Crude Extract (*Hydnophytum formicarum* Jack.)

Nining, S., Muhaimin Rifa'i, M. Sasmito Djati

Biologi Departement, Mathematics and Natural Sciences Faculty,
Brawijaya University, Malang, 2012.

ABSTRACT

Ant Plants (*Hydnophytum formicarum* Jack.) contains a variety of active compounds which are supposed to act as immunomodulators. The aim of this study was to determine the quantitative alteration of CD8⁺CD62L⁺ T cells on spleen, CD4⁺ and CD8⁺ T cell in spleen and thymus. In addition, to knowing the histopathologic liver in healthy BALB/c mice after administration of ant plants crude extract orally. Experimental animals (*Mus musculus*) were treated orally with ant plants for 14 days in morning and evening. Isolation performed on spleen and thymus. Quantitative analysis of the relative number of CD8⁺CD62L⁺ T cells in spleen, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleen and thymus were done using Flowcytometry. Histopathology of liver were observed through liver preparations. Data were analyzed using One-way two factor on the program SPSS 16.0 for Windows. The result of relative number of CD8⁺CD62L⁺ T cells in spleen did not indicate effect significantly. Based on, interaction between doses and organs (spleen and thymus) in each treatment, ant plants crude extract was not having significant effect on quantitative alteration in the relative number of CD4⁺ and CD8⁺ T cell. Histopatology of liver showed that in every treatment did not show difference in hepatocytes.

Key words: histopathology, *Hydnophytum formicarum* Jack., Immunomodulators, CD8⁺ T cells

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya yang telah diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini sebagai salah satu persyaratan untuk meraih gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Penelitian dan penyelesaian penelitian ini tidak lepas dari bimbingan, doa, dukungan serta bantuan dari berbagai pihak. Dengan segala hormat dan kerendahan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak **Muhaimin R., PhD, Med.SC** dan Bapak **Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS** selaku Dosen Pembimbing, atas bimbingan, dukungan, motivasi, bantuan dan berbagai masukan kepada penulis selama penelitian dan penulisan skripsi.
2. Bapak **Widodo, S.Si, Ph.D, Med.Sc** dan Bapak **Drs. Aris Soewondo, M.Si.** selaku Penguji, atas berbagai saran dan kritik yang membangun sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
3. Ibu **Rodliyati Azrianingsih, PhD.** dan Bapak **Muhaimin R., PhD, Med.SC** selaku pembimbing dan penasihat akademik, atas bimbingan dan masukan kepada penulis selama masa perkuliahan hingga skripsi
4. Bapak, Ibu (Almh.), adik, Mas Irawan dan seluruh keluarga besar penulis atas dukungan, do'a , semangat dan motivasi kepada penulis selama menempuh perkuliahan hingga skripsi.
5. Mbak Dewi Satwika S.Si., Mbak Fatma A. Albab S.Si dan Bapak Harmaji atas bantuan, saran kepada penulis selama penelitian dan pengerjaan skripsi.
6. Anny Af'idaturrohmah selaku teman seperjuangan dalam penelitian, Desy N, Anis F.I, F.X. Esti R, Bintan R, dan Ervina Nawa serta seluruh teman-teman Bio'08 atas dukungan, masukan, motivasi, kekompakan selama perkuliahan hingga skripsi.

7. Riyang dan teman-teman KSR 68, Juli, Febriana serta semua pihak yang berperan dalam kelancaran penelitian dan penyelesaian skripsi ini.

Penulisan skripsi ini tentunya masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu diperlukan kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan oleh penulis. Semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi mahasiswa lain maupun masyarakat.

Malang, 13 Juli 2012
Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR ISTILAH/ SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sistem Imun	5
2.2 Organ Limfoid	6
2.3 Tanaman Sarang Semut (<i>Hydnophytum formicarium</i> Jack.).....	7
2.4 Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada <i>Spleen</i> , Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada <i>Spleen</i> serta Timus	10
2.5 Pengaruh Tanaman Sarang Semut Terhadap Sel Limfosit T.....	11
2.6 Histopatologi Organ Hepar	12
2.7 <i>Flowcytometry</i>	13
2.8 Kerangka Konsep	15

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat	17
3.2 Prosedur Kerja Penelitian.....	17
3.2.1 Deskripsi Hewan Coba	17
3.2.2 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan	17
3.2.3 Preparasi Sampel dan Penentuan Dosis Tanaman Sarang Semut (<i>Hydnophytum formicarium</i> Jack.).....	17
3.2.4 Isolasi <i>Spleen</i> dan Timus	18
3.2.5 Analisis Kuantitatif Jumlah Relatif Sel CD8 ⁺ CD62L ⁺ , CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada <i>Spleen</i> dan Timus dengan <i>Flowcytometry</i>	19
3.2.6 Pembuatan dan Pengamatan Histopatologi Preparat Hepar dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin.....	19
3.2.7 Analisis Data.....	20

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada Organ <i>Spleen</i>	21
4.2 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada Organ <i>Spleen</i> dan Timus	24
4.3 Analisis Histologi Hati Setelah Pemberian <i>Crude</i> Ekstrak Umbi Sarang Semut (<i>Hydnophytum formicarium</i> Jack.).....	31

BAB V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran.....	35

DAFTAR PUSTAKA.....	37
----------------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Organ Limfoid	7
Gambar 2.2. <i>Hydnophytum formicarum</i> Jack.	9
Gambar 4.1. Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	21
Gambar 4.2. Profil Presentase Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada Masing-Masing Perlakuan Hasil Analisa <i>Flowcytometry</i>	23
Gambar 4.3. Perbandingan Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺	25
Gambar 4.4. Perbandingan Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺	27
Gambar 4.5. Profil Presentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada Organ Timus Disetiap Perlakuan Hasil Analisa <i>Flowcytometry</i>	28
Gambar 4.6. Profil Presentase Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada Organ <i>Spleen</i> Disetiap Perlakuan Hasil Analisa <i>Flowcytometry</i>	29
Gambar 4.7. Struktur Histologi Hati	32

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1. Komposisi dan kandungan senyawa aktif tanaman sarang semut	10
Tabel 3.2.2. Kelompok Perlakuan	17

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sertifikat Laik Ethik.....	41
Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian.....	42
Lampiran 3. Komposisi larutan.....	43
Lampiran 4. Persiapan Pembuatan <i>Crude</i> Ekstrak Umbo Sarang Semut.....	44
Lampiran 5. Penghitungan Konsentrasi Cekok Umbo Sarang Semut.....	45
Lampiran 6. Isolasi <i>Spleen</i> dan Timus Serta Penghitungan Sel Hidup.....	46
Lampiran 7. Analisa <i>Flowcytometry</i>	47
Lampiran 8. Pembuatan Preparat dengan Pewarnaan HE.....	48
Lampiran 9. Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada Organ <i>Spleen</i> Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.....	50
Lampiran 10. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (<i>One-way two factor</i>) Interaksi Antara Organ (<i>Spleen</i> dan Timus) dan Dosis Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.....	51
Lampiran 11. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (<i>One-way two factor</i>) Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ pada Organ <i>Spleen</i> Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.....	52
Lampiran 12. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (<i>One-way two factor</i>) Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ pada Organ Timus Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.....	53

Lampiran 13. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (<i>One-way two factor</i>) Jumlah Relatif Sel T CD8 ⁺ pada Organ <i>Spleen</i> Melalui Software SPSS 16.0 <i>for Windows</i>	54
Lampiran 14. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (<i>One-way two factor</i>) Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ pada Organ <i>Timus</i> Melalui Software SPSS 16.0 <i>for Windows</i>	55



DAFTAR ISTILAH/ SINGKATAN

Simbol/ Singkatan

Keterangan

APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CD4 ⁺	: molekul permukaan sel (penanda CD4) yang akan berikatan dengan MHC II
CD8 ⁺	: molekul permukaan sel (penanda CD8) yang akan berikatan dengan MHC I
CD62L	: Molekul adhesi
CTL	: <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>
DTH	: <i>Delayed Type Hypersensitivity</i>
FITC	: <i>fluorescein isothiocyanate</i>
IFN- γ	: Interferon gamma
L-selectin	: <i>Leukocyte-selectin (adhesion molecule)</i>
MALTs	: <i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	: <i>Paraformaldehyde</i>
PTKs	: <i>Protein Tyrosine Kinases</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RTKs	: <i>Receptor Tirosin Kinase</i>
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solution</i>
TCR	: <i>T-cell Receptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor- α</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia termasuk negara yang memiliki kekayaan hayati tertinggi kedua setelah Brazil. Indonesia memiliki 30.000 spesies tanaman obat. Namun, tanaman obat yang telah diidentifikasi memiliki khasiat hanya sekitar 940 jenis tanaman, diantara jenis tanaman obat tersebut secara turun temurun telah dipergunakan sebagai pengobatan tradisional oleh masyarakat Indonesia untuk menjaga kesehatan atau mengobati suatu penyakit. Salah satu tanaman obat yang masih terus diteliti adalah tanaman Sarang Semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) (Pramono, 1999). *Hydnophytum formicarum* Jack. merupakan tanaman obat yang telah teruji secara empiris berkhasiat dalam menyembuhkan berbagai penyakit mulai dari *flu* hingga kanker secara aman dan alami. Bagian tanaman yang digunakan sebagai obat adalah bagian umbinya. Tanaman ini diyakini memiliki potensi sebagai tanaman obat yang berperan dalam mengobati berbagai penyakit. Tanaman Sarang Semut termasuk ke dalam famili Rubiaceae, famili ini memiliki lima genus, dari kelima genus tersebut hanya dua genus saja yang berasosiasi dengan semut yaitu *Myrmecodia* (45 spesies) dan *Hydnophytum* (26 spesies). Spesies dari kedua genus tersebut yang dapat digunakan sebagai obat yaitu *Hydnophytum formicarum*, *Myrmecodia pendens* dan *Myrmecodia tuberosa* (Subroto dan Saputra, 2006).

Tanaman Sarang Semut mengandung berbagai senyawa aktif yang bermanfaat bagi tubuh diduga dapat berperan sebagai imunomodulator. Imunomodulator adalah senyawa alami yang dapat menstimulasi, menahan atau memodulasi beberapa komponen sistem imun termasuk respon imun adaptif (spesifik) maupun *innate* (nonspesifik) (Baratawidjaja, 2006). Senyawa-senyawa aktif tersebut antara lain flavonoid dan tannin. Adanya kandungan flavonoid dan tannin pada tanaman Sarang Semut dapat mencegah atau mengobati berbagai penyakit kanker. Senyawa murni stigmasterol pada *Hydnophytum formicarum* Jack. juga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker seperti sel kanker payudara dan sel kanker nasofaring (Subroto dan Saputra, 2006).

Individu yang belum mengalami paparan antigen dapat mengekspresikan CD62L⁺ dalam jumlah yang banyak. Adanya aktivasi dari sel T dapat mempengaruhi jumlah CD62L⁺. Oleh karena itu, sistem imun pada tubuh perlu untuk ditingkatkan yakni dapat dilakukan dengan penambahan senyawa aktif ke dalam tubuh seperti flavonoid dan tannin. Flavanoid dan senyawa aktif lainnya yang terkandung didalam *Hydnophytum formicarum* Jack. dapat mempengaruhi fungsi sel limfosit T seperti CD4⁺ dan CD8⁺ serta IFN- γ dan TNF- α yang berperan untuk mengoptimalkan sitoksisitas dari CD8⁺ sehingga dapat menghancurkan antigen asing seperti sel kanker. Sel CTL (*Cytotoxic T Lymphocytes*) memiliki cara yang sama dengan sel NK dalam melakukan sitotoksis terhadap antigen asing yaitu dengan mengeluarkan perforin sehingga dapat menyebabkan terjadinya apoptosis sel. Adanya pengaruh senyawa-senyawa aktif pada tanaman Sarang Semut dapat diketahui dengan terjadinya perubahan jumlah sel CD8⁺ CD62L⁺ pada organ *spleen*. Selain itu, dapat juga mempengaruhi presentase jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ *spleen* dan timus. Timus merupakan tempat berkembangnya limfosit T. Perkembangan sel T CD4⁺ maupun CD8⁺ di dalam timus sangat ditentukan oleh adanya ketersediaan *self antigen* dan MHC yang diekspresikan oleh sel epitel dalam timus (Rifa'i, 2011). Limfosit yang telah mengalami pemasakan pada organ limfoid primer segera menuju organ limfoid sekunder. Salah satu organ limfoid sekunder adalah *spleen*. *Spleen* adalah bagian dari jaringan limfoid yang paling besar pada tubuh dan cenderung memiliki jumlah sel T CD4⁺ maupun CD8⁺ yang besar.

Pengolahan herbal yang digunakan sebagai obat dapat dilakukan secara sederhana yaitu dengan melarutkan herbal tersebut ke dalam air hangat sehingga dapat diperoleh *crude* ekstrak dari tanaman herbal tersebut. Senyawa aktif yang terkandung didalam herbal tersebut diharapkan dapat meningkatkan sel-sel limfosit. Selain itu, adanya pengamatan histopatologis pada organ hepar pada penelitian ini sangat diperlukan yang berfungsi untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada organ tersebut akibat adanya penambahan senyawa aktif yang terkandung dalam *Hydnophytum formicarum* Jack. Pengamatan histopatologi dilakukan melalui pengamatan terhadap perubahan-perubahan abnormal pada tingkat jaringan secara mikroskopis berdasarkan adanya reaksi yang ditimbulkan setelah pemberian umbi Sarang Semut. Oleh karena itu, maka diperlukan penelitian mengenai

potensi pemberian umbi tanaman Sarang Semut pada dosis yang sesuai dengan harapan dapat diketahui adanya perubahan kuantitatif sel T killer CD8⁺ serta pengamatan histopatologi pada hepar akibat pengaruh pemberian *crude* ekstrak umbi Sarang Semut pada hewan coba sehingga diharapkan umbi Sarang Semut tidak bersifat toksik untuk mencegah atau mengobati suatu penyakit.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimanakah perubahan kuantitatif sel T killer CD8⁺ dan CD62L⁺ pada organ *spleen* serta sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ pada organ *spleen* dan timus setelah pemberian *crude* ekstrak umbi tanaman Sarang Semut secara oral pada mencit BALB/c normal?
2. Bagaimanakah histopatologis hepar mencit BALB/c normal akibat pemberian *crude* ekstrak umbi tanaman Sarang Semut secara oral ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui perubahan kuantitatif sel T killer CD8⁺ dan CD62L⁺ pada organ *spleen* serta sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ pada organ *spleen* dan timus setelah pemberian *crude* ekstrak umbi tanaman Sarang Semut secara oral pada mencit BALB/c normal.
2. Mengetahui histopatologis hepar mencit BALB/c normal setelah pemberian *crude* ekstrak umbi tanaman Sarang Semut secara oral.

1.4 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai pengobatan herbal alternatif dengan dosis yang sesuai untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit seperti flu, wasir, tumor, penyakit jantung hingga kanker serta dapat juga digunakan untuk menambah stamina tubuh seseorang secara aman dan alami.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistem Imun

Sistem imun memiliki kemampuan untuk membedakan “*self*” (molekul pada organisme) dari “*nonself*” (substansi asing) pada tubuh. Sistem imun memiliki kemampuan untuk menetralkan atau melakukan inaktivasi dan menghancurkan molekul asing yang masuk ke dalam tubuh seperti bakteri, parasit dan virus. Imunitas memiliki kemampuan untuk bereaksi terhadap antigen agar terhindar dari suatu penyakit. Sel sistem imun didistribusikan dalam darah, limpa serta jaringan epitel dan konektif, selanjutnya diatur pada nodul berbentuk sperikel yang disebut nodul limfoid. Nodul limfoid ditemukan pada jaringan konektif dan bagian dalam pada beberapa organ lain (Junqueira and Carneiro, 2005). Sel-sel imun terbentuk dalam sumsum tulang atau *bone marrow*. Beberapa diantaranya berpindah dengan masuk ke dalam aliran darah menuju timus, kemudian sel-sel tersebut akan menjadi matang dan berdiferensiasi menjadi limfosit T. Limfosit B juga diproduksi dalam sumsum tulang dan terjadi pematangan sepenuhnya pada sumsum tulang. Limfosit B berperan didalam memproduksi antibodi (Mader, 2004).

Sistem imun dibagi menjadi dua bagian yaitu sistem imun innate dan adaptif. Sistem imun innate berperan sebagai sistem pertahanan pertama dalam melawan patogen dan bekerja secara langsung tanpa melakukan spesifikasi. Patogen yang masuk ke dalam tubuh dapat menimbulkan penyakit dengan berbagai mekanisme. Sistem imun adaptif akan timbul apabila pertahanan pertama tidak mampu mengeliminasi patogen yang masuk. Beberapa senyawa aktif seperti flavonoid dan tannin yang terkandung pada tanaman obat diduga dapat berperan sebagai imunomodulator, dimana dapat memacu sistem kekebalan tubuh. Imunomodulator adalah senyawa alami yang dapat menstimulasi, menahan atau memodulasi beberapa komponen sistem imun termasuk respon imun adaptif (spesifik) maupun innate (nonspesifik). Berbagai bahan yang berasal dari tanaman dapat memacu sistem imun spesifik (proliferasi sel T, sel B yang memproduksi antibodi) maupun nonspesifik (fagosit, sel NK) (Baratawidjaja, 2006).

Imunomodulator dapat dibagi menjadi dua yaitu imunostimulator dan immunosupresor. Imunostimulator adalah senyawa yang dapat meningkatkan respon imun terhadap adanya infeksi seperti alergi, autoimun dan kanker. Imunostimulator dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas sel T, NK-cells dan makrofag serta melepaskan interferon dan interleukin. Immunosupresor adalah senyawa yang dapat menurunkan respon imun (Tan H.T., 2008).

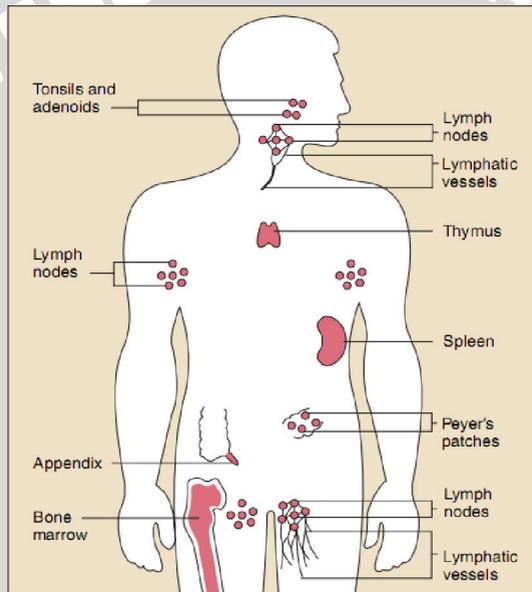
2.2 Organ Limfoid

Organ limfoid merupakan suatu organ yang mengandung sel limfosit didalamnya. Organ limfoid dibedakan menjadi dua jenis yaitu organ limfoid primer atau sentral dan organ limfoid sekunder atau peripheral. Organ limfoid primer meliputi sumsum tulang atau *bone marrow* dan timus sedangkan organ limfoid sekunder yaitu lymph node, spleen, Peyer's patch, tonsil dan beberapa bagian mukosal lainnya yang terasosiasi jaringan limfoid atau dikenal dengan MALTs (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*). Sel-sel limfosit yang terdapat pada organ limfoid primer akan terdistribusi menuju ke organ limfoid sekunder. Selanjutnya, sel limfosit yang terdapat pada organ limfoid sekunder akan mengalami interaksi dengan antigen yang masuk ke dalam tubuh yaitu dengan melakukan adaptasi pada bagian sistem *innate immunity* (Junqueira and Carneiro, 2005).

Timus merupakan tempat berkembangnya limfosit T. Timus terletak pada mediastinum, timus berkembang secara maksimal selama usia muda, dan tetap memproduksi limfosit hingga usia tua. Organ timus akan membesar semenjak lahir hingga masa pubertas. Setelah masa pubertas (ketika sudah menua), maka organ timus akan mengecil sehingga ukuran timus ketika masih usia muda lebih besar daripada ukuran timus pada usia dewasa atau tua. Hal ini pula yang menyebabkan penurunan respon immunitas seiring bertambahnya usia (Junqueira and Carneiro, 2005). Perkembangan sel T CD4⁺ maupun CD8⁺ di dalam timus sangat ditentukan oleh adanya ketersediaan *self antigen* dan MHC yang diekspresikan oleh sel epitel dalam timus (Rifa'i, 2011).

Spleen adalah bagian dari jaringan limfoid yang paling besar pada tubuh dan berada pada sirkulasi darah. Berat *spleen* pada orang dewasa sekitar 113-141 g. *Spleen* berperan dalam penangkapan dan memproses antigen, *homing*, proliferasi limfosit dan aktivasi makrofag (Witztum, 2002). *Spleen* sangat penting dalam pertahanan melawan antigen yang

mencapai sirkulasi darah. Selain itu, spleen juga sebagai tempat untuk menghancurkan sel darah merah yang sudah tua. *Spleen* bukan merupakan organ yang vital pada usia dewasa namun membantu organ lain dalam memproduksi limfosit serta memfilter darah. (Junqueira and Carneiro, 2005). Susunan *spleen* dan lymphnode memiliki persamaan, namun antigen yang masuk ke dalam organ *spleen* lebih banyak berasal dari darah dibandingkan dari cairan ekstraselluler (lymph) (Rifa'i, 2011).



Gambar 2.1. Organ Limfoid (Kelly, 2007)

2.3 Tanaman Sarang Semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.)

Hydnophytum formicarum Jack. atau tanaman Sarang Semut merupakan salah satu jenis tanaman herbal yang terdapat di Indonesia, tanaman tersebut termasuk ke dalam famili Rubiaceae. Tanaman Sarang Semut ini tersebar di wilayah Asia Tenggara seperti Indonesia, Malaysia, Thailand dan Vietnam. *Hydnophytum formicarum* Jack.

merupakan tanaman perdu dan dapat tumbuh hingga 60 cm. Tanaman ini memiliki batang silindris, berkayu, tidak bercabang, permukaannya tidak berduri. Daun tunggal dengan bentuk bulat panjang, tersusun menyebar dan cenderung lebih banyak terdapat pada ujung batang, panjang antara 7-15 cm dan lebar antara 2-4 cm. *Hydnophytum formicarum* Jack. memiliki bunga berwarna putih dan buahnya berbentuk bulat serta berwarna merah (Prachayasittikul et.al, 2008). Tumbuhan ini bersifat epifit, yaitu menempel pada tumbuhan lain, tidak hidup secara parasit pada inangnya tetapi hanya memanfaatkannya untuk menempel (Subroto dan Saputra, 2006).

Tanaman Sarang Semut lebih banyak ditemukan di hutan dan daerah pertanian terbuka dengan ketinggian sekitar 600 m. Tanaman ini banyak ditemukan menempel pada beberapa pohon, umumnya di pohon kayu putih, cemara gunung, dan pohon beech, tetapi jarang pada pohon-pohon dengan batang halus dan rapuh seperti Eucalyptus (Subroto dan Saputra, 2006). Tanaman Sarang Semut ini bersimbiosis mutualisme dengan semut. Di habitat liarnya Sarang Semut dihuni oleh beragam jenis semut dan umumnya oleh tiga spesies dari genus *Iridomyrmex*. Tanaman ini memiliki umbi yang berlubang-lubang seperti Sarang Semut, berfungsi untuk menyerap air dan substansi agar dapat memperoleh nutrisi dari material dan debris yang dibawa oleh semut. Sebaliknya, tanaman ini menyediakan makanan untuk semut dalam bentuk nectar atau protein lain sehingga tanaman ini lebih dikenal sebagai tanaman Sarang Semut (Prachayasittikul et.al, 2008).

Klasifikasi dari tanaman Sarang Semut, yaitu (Plantamor, 2011):

Kingdom :Plantae
Divisi :Magnoliophyta
Kelas :Magnoliopsida
Ordo :Rubiales
Famili : Rubiaceae
Genus : *Hydnophytum*
Spesies : *Hydnophytum formicarum* Jack.



Gambar 2.2. *Hydnophytum formicarum* Jack. (Succulent,2011)

Beberapa kandungan zat yang dimiliki oleh tanaman Sarang Semut antara lain zat antioksidan, flavonoid, tannin, tokoferol dan polisakarida. Selain itu, tanaman Sarang Semut juga mengandung multimineral yang meliputi kalsium, natrium, kalium, seng, besi, fosfor dan magnesium (Subroto dan Saputra, 2006). Tanaman Sarang Semut memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan dari sel HeLa dan MCM-B2 yang dapat memicu terjadinya penyakit kanker (Soeksmanto dkk, 2010). Secara empiris, tanaman ini memiliki manfaat dalam menyembuhkan berbagai penyakit seperti penyakit jantung bahkan sebagai anti inflamasi dan anti kanker. Hal ini dikarenakan adanya kandungan flavonoid dan tannin pada tanaman ini. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak terdapat dalam pigmen tumbuhan. Flavonoid memiliki fungsi sebagai antioksidan yang dapat mencegah terjadinya kanker, melindungi struktur sel, antiinflamasi (Harun dan Syari, 2002).

Tanin merupakan salah satu jenis senyawa yang termasuk ke dalam golongan polifenol. Senyawa tanin banyak dijumpai pada tumbuhan. Tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis. Tanin diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terkondensasi biasanya berbentuk polimer, jenis ini didominasi dengan flavonoid sebagai monomernya (Hagerman, 2002).

Tabel 2.1. Komposisi dan kandungan senyawa aktif tanaman Sarang Semut (Subroto dan Saputra, 2006)

Parameter	Satuan	Nilai
Energi	Kkal/100g	350,52
Kadar air	g/100g	4,54
Kadar abu	g/100g	11,13
Kadar lemak	g/100g	2,64
Kadar protein	g/100g	2,75
Kadar karbohidrat	g/100g	78,94
Tokoferol	mg/100g	31,34
Total fenol	g/100g	0,25
Kalsium (Ca)	g/100g	0,37
Natrium (Na)	mg/100g	68,58
Magnesium (Mg)	g/100g	1,50
Kalium (K)	g/100g	3,61
Seng (Zn)	mg/100g	1,36
Besi (Fe)	mg/100g	29,24
Fosfor (P)	g/100g	0,99

2.4 Sel T CD8⁺CD62L⁺ pada *Spleen*, Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada *Spleen* serta Timus

Sel T CD8⁺ disebut dengan istilah sel T killer (sitotoksik). Sel T sitotoksik mempunyai reseptor antigen yang terikat dengan fragmen antigen dimana diperlihatkan oleh molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas I. Molekul MHC merupakan membran yang membatasi protein. Molekul MHC I ditemukan pada sebagian besar jaringan tubuh sedangkan molekul MHC II yang berinteraksi dengan sel T *helper* ditemukan hanya pada APC (*Antigen Presenting Cells*). CD8⁺ mengikat *site* reseptor pada MHC kelas I, sel T CD8⁺ hanya dapat merespon antigen yang dipresentasikan oleh molekul kelas I (Meijers et.al, 2005). Sel T CD 8⁺ dapat melawan sel asing atau virus yang menginfeksi sel dengan dua mekanisme utama. Mekanisme pertama adalah sel T CD 8⁺ melekat pada sel sebagai sel T killer dan mengeluarkan protein disebut dengan *perforins* yang membuat rongga pada membran sel target yang mengakibatkan sel menjadi lisis. Mekanisme lain yaitu sel T CD8⁺ menempel pada sel dan

membunuhnya dengan mekanisme *trigger* yang menginduksi terjadinya kematian sel atau apoptosis (Junqueira and Carneiro, 2005).

Perkembangan sel T CD4⁺ maupun CD8⁺ di dalam timus sangat ditentukan oleh adanya ketersediaan *self antigen* dan MHC yang diekspresikan oleh sel epitel dalam timus (Rifa'i, 2011). Subpopulasi limfosit T, limfosit T *helper* dan sel T sitotoksik memiliki peranan yang sama dalam mengeliminasi antigen asing yang masuk ke dalam tubuh seperti antigen tumor. Sel T CD4⁺ mempunyai potensi menghasilkan sitokin yang mampu memacu aktivasi sel-sel yang lain (Liu *et.al.*, 2005).

CD62L⁺ diekspresikan pada seluruh leukosit yang meliputi limfosit, neutrofil, monosit dan makrofag serta mengatur adanya migrasi sel-sel tersebut pada tempat inflamasi dan sel T *naive* pada limpa node peripheral. Sel T *naive* merupakan sel T yang belum pernah mengalami paparan antigen dimana mengekspresikan molekul CD62L⁺. Sel T mengekspresikan molekul CD62L⁺ sebanyak lebih dari 80 % pada individu yang sehat atau normal (Tedder *et al.*, 1995). CD62L⁺ memiliki peranan penting pada generasi respon sel T primer, respon DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*) dan migrasi neutrofil pada *site* reaksi DTH (Xu *et al.*, 1996).

2.5 Pengaruh Tanaman Sarang Semut Terhadap Sel Limfosit T

Adanya radikal bebas dapat memicu beragam penyakit degenerative seperti kanker, diabetes dan penyakit lainnya. Radikal bebas dapat dihasilkan oleh sel didalam tubuh dan juga oleh lingkungan luar seperti paparan polusi, makanan yang tidak sehat. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan bersifat sangat reaktif. Radikal bebas dapat berpengaruh pula pada sisitem imun yaitu dapat menurunkan sistem imun sehingga dapat mengakibatkan terjadinya aktivasi pada berbagai sel termasuk sel T dan sel T akan kehilangan molekul CD62L. Oleh karena itu, sistem imun pada tubuh perlu untuk ditingkatkan (Middleton *et.all*, 2000).

Aktivitas radikal bebas tersebut dapat dihambat oleh adanya antioksidan. Antioksidan adalah senyawa atau molekul yang mampu memberikan elektron untuk menstabilkan radikal bebas. Antioksidan dapat berupa enzim atau non enzim. Salah satu antioksidan yang berasal dari non enzim yaitu senyawa flavonoid. Flavonoid dan beberapa

senyawa aktif lainnya terdapat pada tanaman Sarang Semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) yang diduga dapat berperan sebagai imunomodulator. Flavanoid dapat mempengaruhi fungsi sel T. Flavanoid akan memicu limfosit T sitotoksik, sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag untuk menghancurkan sel kanker yang dikenal sebagai sel asing. Sel CTL (*Cytotoxic T Lymphocytes*) dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin. Proliferasi sel T melakukan interaksi antara CD4, CD8, dan TCR-CD3 dalam mengenal dan membunuh antigen asing yang dipresentasikan oleh molekul MHC. Sebagian kecil dari sel yang mengandung antigen asing juga mengekspresikan antigen tersebut bersama molekul MHC kelas II sehingga dapat membentuk CD4 dan mengaktifasi sel *t-helper* 1 untuk mensekresi limfokin IFN- γ dan TNF- α dimana berperan dalam merangsang sel tersebut untuk lebih mengekspresikan MHC kelas I sehingga akan lebih mengoptimalkan sitotoksitas dari CD8 (Sumarno, 2010). Sinyal proliferasi dihasilkan oleh anggota kelompok PTKs (*Protein Tyrosine Kinases*) yang mengkatalisis fosforilasi substrat selular, berperan dalam proliferasi sel T. Flavanoid dapat mempengaruhi atau menghambat aktivitas PTKs, sehingga dapat menyebabkan terjadinya apoptosis sel (Middleton et.all, 2000).

2.6 Histopatologi Organ Hepar

Pemeriksaan histologi adalah salah satu cara untuk mendeteksi adanya komponen patogen yang bersifat infeksiif melalui pengamatan secara mikro anatomi. Pemeriksaan histopatologi dilakukan melalui pemeriksaan terhadap perubahan-perubahan abnormal pada tingkat jaringan. Pemeriksaan histopatologi bertujuan untuk memeriksa penyakit berdasarkan pada reaksi perubahan jaringan. Salah satu pemeriksaan histopatologi sering dilakukan pada organ hepar. Organ hepar merupakan organ yang paling kompleks dan penting bagi tubuh manusia. Fungsi utama organ ini adalah mengontrol substansi yang terserap dari sistem pencernaan sebelum didistribusikan menuju sistem sirkulasi. Organ hepar memiliki pengaruh terhadap organ lain didalam tubuh seperti pada sistem pencernaan, sistem saraf dan sistem imun. Organ hepar memiliki banyak kelenjar getah bening yang dapat berperan dalam sistem imun. Beberapa penyakit yang umum terjadi

pada organ hepar meliputi serosis, hepatitis, penyakit hepar akibat alkoholik, hemokromatosis, dan kanker hepar (Allen, 2002).

Suatu senyawa apabila diberikan secara oral akan masuk ke dalam tubuh melalui saluran cerna, kemudian ditransformasikan ke sirkulasi portal hepatic dan dibawa langsung menuju hati sehingga hati rentan terhadap pengaruh adanya suatu zat yang masuk dalam jumlah relatif banyak dalam sirkulasi (Dewi, 2009). Bentuk perubahan gambaran histopatologis terhadap sel hepatosit dapat berupa degenerasi, dan tanda-tanda nekrosis berupa kariolisis, karioreksis dan inti piknotik. Beberapa penyebab sel mengalami kerusakan dapat disebabkan oleh bahan kimia, mikroorganisme, virus serta substansi atau agen lain yang berbahaya (Junqueira, 2005).

2.7 *Flowcytometry*

Flowcytometry merupakan alat yang digunakan menganalisis, mengamati serta menghitung sel-sel limfosit. Analisis dengan menggunakan flowcitometry dapat digunakan untuk melakukan analisis multiparameter terhadap karakteristik sel secara kimia maupun fisika. *Flowcitometry* menggunakan prinsip penyebaran cahaya, eksitasi cahaya, dan pemancaran molekul fluorokrom untuk menghasilkan multiparameter data yang spesifik dari partikel dan sel dengan ukuran tertentu dimana ukuran diameternya antara 0.5- 40 μm . (School of medicine, 2006).

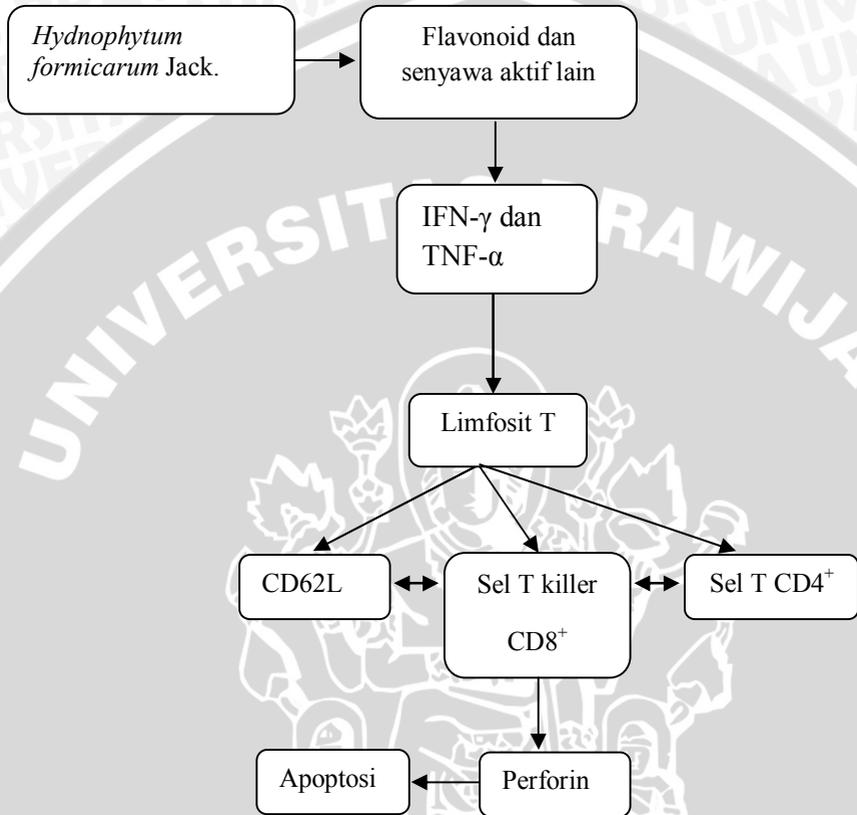
Salah satu pokok dari *flowcytometry* adalah kemampuan untuk mengukur sifat dari setiap partikel. Ketika sampel pada larutan dimasukkan ke dalam *flowcytometry*, partikel didistribusikan secara acak pada ruang tiga dimensi. Sampel harus urut dalam aliran partikel tunggal sehingga dapat diketahui oleh sistem deteksi mesin. Sistem ini diatur oleh sistem fluid. Aplikasi utama *flowcytometry* yaitu memisahkan sel berdasarkan subtipe atau ekspresi epitop berdasarkan sifat biologi. Proses ini disebut sebagai *cell sorting* atau analisis FACSTM. Panjang gelombang eksitasi bersifat kritikal terhadap jumlah photon cahaya florokrom yang terserap. FITC (*fluorescein isothiocyanate*) sebagai contoh, akan menyerap cahaya dalam jarak 400-550 nm tetapi panjang gelombang 490 nm merupakan absorbansi yang maksimal atau puncak. Prinsip penting dari analisis data *flowcytometry*

adalah visualisasi sel yang diinginkan secara selektif ketika hasil eliminasi dari partikel yang tidak diinginkan seperti sel mati dan debris (Rahman, 2006).

Apabila ditinjau secara hidrodinamika, sel-sel difokuskan dalam sebuah tabung yang berisi PBS sebelum ditangkap oleh sumber cahaya, sel dipresentasikan menuju sumber cahaya (laser). Sel-sel akan mengalir satu persatu hingga pada pusat aliran dan setiap sel akan tersinari oleh laser. Laser merupakan sumber cahaya yang umum digunakan sebagai sumber cahaya pada analisis dengan menggunakan *flowcytometry*. Laser menghasilkan panjang gelombang tunggal dari cahaya pada satu atau lebih cahaya koheren (School of medicine, 2006).



2.8 Kerangka Konsep



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Percobaan ini dilaksanakan pada bulan Januari 2012 hingga Juni 2012, bertempat di *Animal Room* Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Prosedur Kerja Penelitian

3.2.1 Deskripsi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit BALB/c (*Mus musculus*), umur 6 minggu dengan kondisi sehat yaitu bergerak aktif, bulu tidak rontok, kaki tidak bengkok. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan meliputi kontrol, perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III dengan 3 ulangan pada masing-masing perlakuan. Jumlah sampel mencit yang digunakan adalah 12 ekor.

3.2.2 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap yaitu terdiri dari 4 perlakuan dengan 3 ulangan pada setiap perlakuan, seperti pada tabel berikut ini :

Tabel 3.2.2. Kelompok Perlakuan

Perlakuan (mencit normal)	Kontrol (<i>non oral treatment</i>)
	Dosis I (0,1 mg/g BB)
	Dosis II (0,5 mg/ g BB)
	Dosis III (1 mg/g BB)

3.2.3 Preparasi Sampel dan Penentuan Dosis Tanaman Sarang Semut (*Hydnophytum formicarium* Jack.)

Umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarium* Jack.) yang digunakan diambil dari daerah gunung Kelud, kabupaten Kediri. Umbi sarang semut yang digunakan adalah umbi yang masih segar dan sehat. Umbi sarang semut diambil, dicuci dan dipotong kecil-kecil. Kemudian,

umbi tersebut dikeringkan di bawah sinar matahari untuk menghilangkan airnya, selanjutnya umbi dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 70°C untuk mempertahankan keringnya. Umbi sarang semut yang telah kering kemudian dihaluskan hingga menjadi bubuk. Bubuk sarang semut disimpan pada suhu ruang.

Bubuk umbi sarang semut ditambahkan air hangat kemudian dihomogenasi selama 5 menit. Larutan *crude* ekstrak bubuk umbi sarang semut tersebut, diberikan secara oral (sonde) pada mencit sebanyak 0,1 mg/g BB (dosis I), 0,5 mg/g BB (dosis II) dan 1 mg/g BB (dosis III). Perlakuan secara oral pada mencit dilakukan selama 2 minggu atau 14 hari pada pagi dan sore hari.

3.2.4 Isolasi *Spleen* dan Timus

Mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, kemudian dilakukan *sectio* untuk mengambil organ *spleen* dan timus. *Spleen* dan timus kemudian dicuci dalam PBS steril sebanyak 3 kali. Masing-masing organ *spleen* dan timus diletakkan pada cawan petri yang berbeda yang telah berisi PBS steril, dipencet dengan menggunakan pangkal spuit (arah pemencetan searah dengan jarum jam yaitu dari atas ke bawah sebanyak 2-3 kali). *Spleen* dan timus yang telah dihaluskan kemudian disaring dengan *wire* dan diletakkan pada BD nylon cell stainer™ 1000 µm. Suspensi pada BD nylon cell stainer™ 1000 µm yang telah ditambahkan PBS steril selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet disuspensikan kembali dengan PBS steril sebanyak 100-1000 µl dan dihomogenkan. Apabila suspensi masih berwarna merah (untuk organ *spleen*) maka dilakukan sentrifugasi kembali hingga mendapatkan pelet yang berwarna putih. Supernatan dibuang, pelet dimasukkan pada mikrotube steril dan ditambahkan PBS sebanyak 500 µl. Selanjutnya, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 3 menit. Kemudian disimpan pada suhu 4°C.

3.2.5 Analisis Kuantitatif Jumlah Relatif Sel CD8⁺ CD62L⁺, CD4⁺ dan CD8⁺ pada *Spleen* dan Timus dengan *Flowcytometry*

Homogenat yang telah disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 3 menit, dibuang supernatannya dan pelat yang dihasilkan kemudian diresuspensi dengan 1 ml PBS steril dan dihomogenasi. Homogenat diambil sebanyak 100 µl dan dimasukkan pada *microtube* baru. Homogenat disentrifugasi kembali pada kecepatan

3200 rpm pada suhu 4°C selama 2 menit. Supernatan dibuang dan microtube yang berisi pelet diletakkan pada *ice box*. Pelet dalam microtube kemudian ditambahkan dengan antibodi anti CD8⁺CD62L⁺ dan CD4⁺CD8⁺ pada sampel organ *spleen* serta ditambahkan pula antibodi anti CD4⁺CD8⁺ pada organ timus selama 15 menit. Pelet diambil dan dimasukkan dalam kuvet *flowcytometer* dengan mikropipet dan ditambah 100 µl PBS steril. Kemudian, kuvet dipasang pada *nozzleBD Biosciences FACSCalibur™ flowcytometer*. Panel “acquire” pada kotak Acquisition control ditekan, data diolah dengan menggunakan software *BD CellQuestPro™*.

3.2.6 Pembuatan dan Pengamatan Histopatologi Preparat Hepar dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Mencit yang telah dibedah, organ heparnya diisolasi khususnya pada bagian tengah lobus dari mencit yang telah dibedah. Organ dicuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali dan dimasukkan dalam larutan fiksatif PFA 4% dalam PBS, suhu 16°C selama 1-7 hari. Organ didehidrasi dengan seri etanol 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 12 jam, dan etanol 90%-95% masing-masing selama 20 menit. Kemudian, perendaman organ dilanjutkan pada ethanol absolute selama tiga kali masing-masing selama 20 menit. Organ direndam dalam xilol I selama 2x30 menit pada suhu ruang, dilanjutkan dengan xilol II selama 30menit pada suhu 60-63°C. Kemudian, organ direndam dalam xilol:paraffin (3:1, 1:1, dan 1:3) dan paraffin murni masing-masing selama 30 menit pada suhu 56-58°C. organ ditanam (*embedding*) yaitu dengan mencelupkan organ pada paraffin cair dalam blok cetakan. De-gas dilakukan dengan mencelupkan lempeng logam untuk menarik gelembung udara dalam cairan paraffin dan dibiarkan hingga paraffin mengeras dan disimpan pada 4°C. Organ iris dengan ukuran 5µm. Pita irisan diambil dengan kuas dan dimasukkan air hangat pada nampan logam yang diletakkan diatas *hot plate* dengan suhu 40°C. Irisan diambil dengan gelas objek. Selanjutnya pita paraffin dikeringkan, ditempelkan pada gelas objek dan diletakkan pada *hot plate* (38-40°C). Preparat disimpan pada suhu 38-40°C selama 24 jam.

Preparat dideparafinasi dengan dicelupkan dalam xilol sebanyak dua kali selama 10 menit untuk menghilangkan paraffin yang ada pada organ. kemudian, preparat direndam dalam etanol bertingkat (100,95,90,80,70,60,dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Preparat dicuci dengan akuades mengalir selama lima menit. Selanjutnya, diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 detik. Preparat dicuci dengan akuades mengalir selama 5 menit dan direndam dalam etanol bertingkat 30,60, dan 70%, masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan preparat dengan pewarna eosin selama 1 menit. Lalu direhidrasi dalam etanol bertingkat 70,60,30% masing-masing selama 5 menit. *Clearing* preparat dilakukan dengan xilol sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit dan dilakukan *mounting* dengan entellan. Pewarna hematoksilin akan mewarnai inti sel sehingga tampak berwarna ungu, sedangkan Eosin akan mewarnai sitoplasma sehingga berwarna merah. Preparat diamati histopatologinya dengan mikroskop BX51 *Digital Imaging Microscope*. Pengamatan difokuskan pada ada tidaknya kerusakan yang terjadi pada sel-sel hepatosit organ hepar.

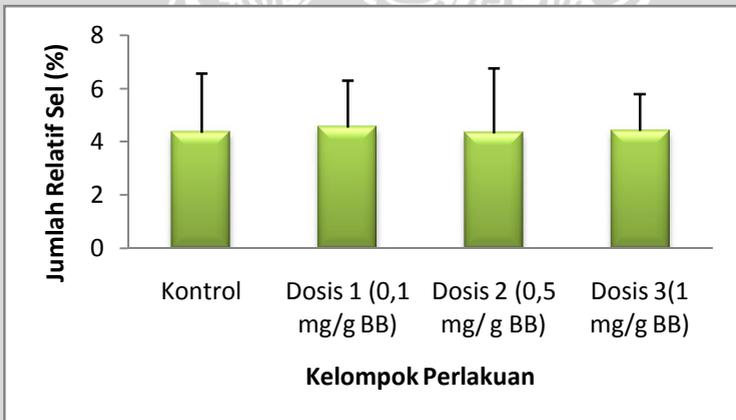
3.2.7 Analisis Data

Analisa jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ *spleen* dan timus dilakukan *Arc Sine Square Root Transformation*, sebelum dilakukan analisa menggunakan program SPSS. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) yaitu dianalisis dengan menggunakan uji RAL faktorial (*One-way two factor*). Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 *for Windows*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Jumlah Relatif Sel T $CD8^+CD62L^+$ pada Organ *Spleen*

Hasil analisa *flowcytometry* pada *spleen* (Gambar 4.1) menunjukkan tidak terjadi perubahan yang signifikan rata-rata jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ pada setiap perlakuan sehingga dapat dikatakan bahwa perlakuan yang diberikan pada masing-masing mencit perlakuan dengan kondisi hewan coba sehat memberikan pengaruh yang sama (tidak berbeda nyata) terhadap jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ pada organ *spleen*. Berdasarkan Gambar 4.1 dapat diketahui bahwa dosis 1 (0,1 mg/g BB) memiliki jumlah relatif sel lebih tinggi dari ketiga perlakuan yang lain yaitu 4,55 % walaupun tidak berbeda nyata. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Subroto dan Hendro (2006) menunjukkan bahwa tanaman sarang semut mengandung senyawa-senyawa kimia dari golongan flavonoid dan tannin. Flavonoid berperan penting bagi kesehatan yakni dapat mencegah adanya kanker, anti-inflamasi serta mencegah dan mengobati penyakit lain.



Gambar 4.1 Jumlah Relatif Sel T $CD8^+CD62L^+$

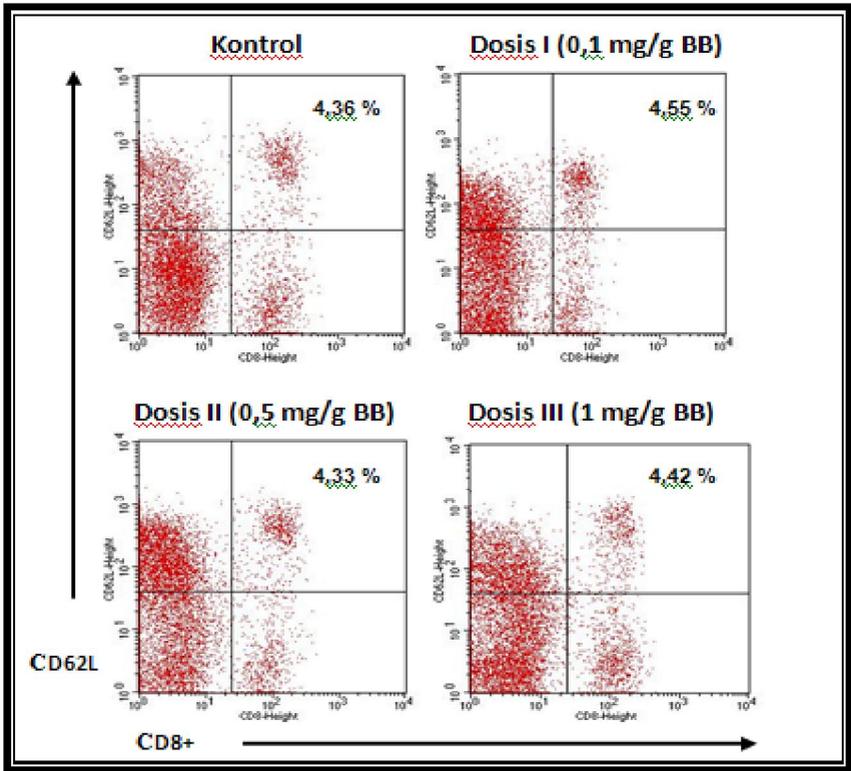
Adanya kandungan flavonoid pada tanaman sarang semut diharapkan dapat meningkatkan jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ secara signifikan pada setiap perlakuan. Namun, berdasarkan hasil

dalam penelitian ini tidak menunjukkan adanya peningkatan atau penurunan maupun perubahan kuantitatif pada sel T CD8⁺CD62L⁺ yang dapat dikarenakan pada penggunaan dosis yang kurang besar dan berbeda pada setiap perlakuan sehingga kurang menunjukkan adanya perubahan kuantitatif sel T CD8⁺CD62L⁺ pada organ *spleen*. Pemberian *crude* ekstrak umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) dengan dosis yang berbeda-beda pada penelitian ini tidak dapat meningkatkan jumlah relatif sel T CD8⁺CD62L⁺. Hal ini dapat dikarenakan dosis yang digunakan pada penelitian ini kurang tinggi pada setiap perlakuan sehingga tidak memberikan efek yang signifikan terhadap jumlah relatif CD8⁺CD62L⁺. Namun, jumlah relatif sel T CD62L⁺ cenderung mengalami peningkatan pada setiap perlakuan. Jumlah relatif sel T CD62L⁺ paling meningkat pada dosis 2 (0,5 mg/g BB) yaitu 33,21 % dan mengalami penurunan jumlah relatif sel T CD62L⁺ pada perlakuan dosis 3 (1 mg/g BB).

CD62L⁺ (L selektin) merupakan molekul adhesi. CD62L⁺ berfungsi untuk melakukan pelekatan dan rolling pada sel endotel sepanjang pembuluh darah. Molekul CD62L⁺ diekspresikan oleh sel T naïve. Sel T naïve yaitu sel T yang belum pernah terpapar antigen, sel T naïve bersirkulasi dalam darah, *spleen*, dan lymphnode periferall hingga selanjutnya bertemu dengan antigen yang sesuai pada sel dendritik yang *mature*. Sel T yang teraktivasi akan kehilangan ekspresi CD62L⁺. Sel T mengekspresikan molekul CD62L⁺ umumnya lebih dari 80 % pada individu sehat (Rifa'i, 2011). Sedangkan pada individu yang tidak sehat, ekspresi CD62L⁺ oleh sel T naïve berkurang pada lymphnode periferall dan akan menyebabkan terjadinya aktivasi berbagai sel termasuk sel T sehingga sel T kehilangan molekul CD62L⁺. Aktivasi selanjutnya, CD62L⁺ dengan cepat melakukan *down-regulated* pada sel T, yang menghalangi efektor sel T dari menuju lymphnode dalam sel endotel. Pengeluaran dari lymphnode diyakini untuk mencegah *killing* antigen-presenting sel dendritik oleh aktivasi sel T CD8⁺, untuk mengubah migrasi sel T dari organ limfoid sekunder menuju jaringan tersier, dan untuk meningkatkan sel T yang berlebihan pada tempat pathogen masuk. Pemeriksaan limfosit pada individu yang tua menunjukkan adanya penurunan ekspresi molekul CD62L⁺.

CD62L⁺ diekspresikan oleh seluruh leukosit, termasuk limfosit T, neutrofil, monosit, dan makrofag, serta meregulasi migrasi sel-sel ini sebagai tempat inflamasi dan homing sel T naïve menuju lymphnode

peripheral (Tedder *et al.*, 1995). $CD62L^+$ pada mencit sakit juga menunjukkan bahwa $CD62L^+$ berperan penting pada respon generasi sel T primer, respon DTH (*Delayed-Type Hypersensitivity*), dan migrasi neutrofil menuju tempat reaksi DTH (Xu *et al.*, 1996).



Gambar 4.2 Profil Presentase Jumlah Relatif Sel T $CD8^+CD62L^+$ pada Masing-Masing Perlakuan Hasil Analisa *Flowcytometry*

Profil jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ pada masing-masing perlakuan juga dapat diketahui pada gambar 4.2. Berdasarkan gambar 4.2, perlakuan pada dosis 1 (0,1 mg/g BB) memiliki presentase yang lebih tinggi dibandingkan kontrol walaupun tidak berbeda nyata. Perubahan jumlah relatif sel T $CD8^+CD62L^+$ yang tidak signifikan pada

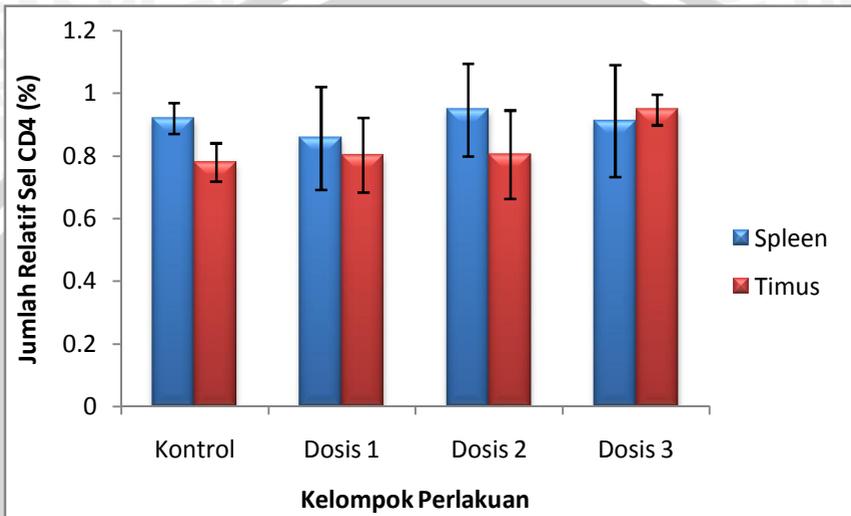
masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan pada setiap mencit tidak memiliki pengaruh terhadap jumlah sel T CD8⁺CD62L⁺ pada organ *spleen*. Sel T CD8⁺ mempunyai kemampuan *killing* pada target yang dikenali sebagai antigen. Sel T sitotoksik memiliki peranan membunuh sel-sel yang terinfeksi oleh virus. CD 8⁺ merupakan molekul permukaan yang diekspresikan oleh sel T sitotoksik. CD 8⁺ adalah protein yang memiliki kompetensi berikatan dengan MHC (*Major Hystocompatibility Complex*) (Kuby J, 1997). Berdasarkan penelitian Schwaiger, *et. All.*, (2003) menyatakan bahwa sekitar 15 % CD8⁺ terdapat pada individu sehat yang berusia 41-60 tahun dan sekitar 36 % CD8⁺ terdapat pada individu yang berusia 61-90 tahun.

4.2 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada Organ *Spleen* dan Timus

Berdasarkan hasil analisa *flowcytometry* sel T CD4⁺ pada organ timus dan *spleen* menunjukkan perbedaan jumlah relatif sel T CD4⁺ mencit normal walaupun tidak signifikan ($P>0,05$). Jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ timus dan *spleen* mengalami peningkatan pada masing-masing perlakuan namun tidak signifikan. Perlakuan kontrol pada organ timus memiliki jumlah relatif sel T CD4⁺ paling rendah dibandingkan dengan ketiga perlakuan yang lain yaitu 0,78 % (dilakukan transformasi) (lampiran 11). Jumlah CD4⁺ pada umumnya meningkat pada individu sehat, sedangkan pada individu yang sakit atau terserang infeksi dapat menyebabkan terjadinya penurunan jumlah limfosit T CD4⁺. Limfosit T CD4⁺ memegang peranan yang sangat penting dalam sistem kekebalan tubuh manusia, sehingga bila jumlah dan fungsinya terganggu dapat menyebabkan seseorang mudah diserang penyakit infeksi dan kanker.

Perlakuan pada mencit sehat dosis 3 (1 mg/g BB) menunjukkan jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ timus paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yaitu 0,95 % (lampiran 11). Hal ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan pada mencit perlakuan maka dapat meningkatkan jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ timus walaupun tidak signifikan ($P>0,05$). Sel-sel limfosit dihasilkan oleh organ limfoid primer dan selanjutnya akan menuju ke organ limfoid sekunder. Sumsum tulang dan timus merupakan organ limfoid primer. Limfosit B dan limfosit T berasal dari sumsum tulang.

Limfosit B mengalami pemasakan pada sumsum tulang sedangkan limfosit T melakukan migrasi menuju timus sebelum masak dan limfosit T mengalami pemasakan pada timus.

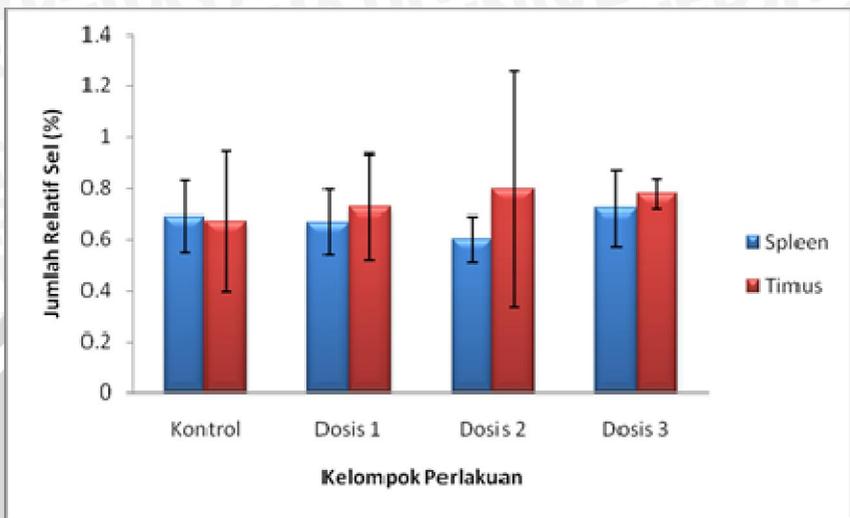


Gambar 4.3 Perbandingan Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ ($p > 0,05$) (Dosis 1 = 0,1 mg/g BB, Dosis 2=0,5 mg/ g BB, Dosis 3= 1 mg/ g BB) pada organ *Spleen* dan Timus

Setiap perlakuan yang diberikan pada masing-masing mencit sehat tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ *spleen* maupun interaksi antara organ dan masing-masing dosis yang diberikan pada setiap perlakuan (lampiran 9). Perlakuan kontrol pada organ *spleen* memiliki jumlah relatif sel T CD4⁺ lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan dosis 1 (0,1 mg/ g BB) dan dosis 3 (1 mg/ g BB) yaitu 0,92 % walaupun tidak signifikan (lampiran 10). Perlakuan dosis 2 (0,5 mg/ g BB) menunjukkan jumlah relatif sel T CD4⁺ paling tinggi dibandingkan dengan ketiga perlakuan yang lain yaitu 0,95 % walaupun tidak berbeda nyata (lampiran 10). Rata-rata jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ

spleen cenderung lebih tinggi di setiap perlakuannya dibandingkan dengan rata-rata jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ timus. Sel T CD4⁺ umumnya tidak memiliki sifat sitotoksik seperti sel T CD8⁺ terhadap tumor maupun penyakit lain, namun sel-sel tersebut dapat berperan dalam respon antitumor dengan memproduksi berbagai *sitokin* yang diperlukan untuk perkembangan sel-sel CTL (*Cytotoxic T Lymphocytes*) menjadi sel efektor (Sumarno, 2010).

Senyawa-senyawa aktif yang terkandung di dalam umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) seperti flavonoid dan tanin memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel kanker. Hasil tersebut merupakan hasil penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Qui Kim Tran dari University National of Hochiminch City, Yasuhiro Tezuka, Yuko Harimaya, dan Arjun Hari Banskota yakni dengan menumbuhkan tiga sel kanker dalam ekstrak sarang semut dengan menggunakan berbagai pelarut meliputi air, metanol, dan campuran metanol-air. Senyawa flavonoid yang terkandung di dalam tanaman obat (*herbal medicine*) mempunyai pengaruh atau efek dalam memblok reseptor *growth factor* serta menginhibisi *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) pada jalur sinyal *Receptor Tyrosin Kinase* (RTKs) (Sumarno, 2010). Banyak tanaman obat (*herbal medicine*) yang telah diteliti memiliki peran sebagai imunomodulator. Modulasi sistem imun dapat ditunjukkan dengan adanya perubahan yang melibatkan induksi, ekspresi, amplifikasi atau inhibisi bagian-bagian dari fase respon imun. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Tazulakhova (2001), melaporkan bahwa flavonoid alamiah dapat menstimulasi produksi *Interferon -γ* (IFN- γ) dalam suatu populasi immunosit.

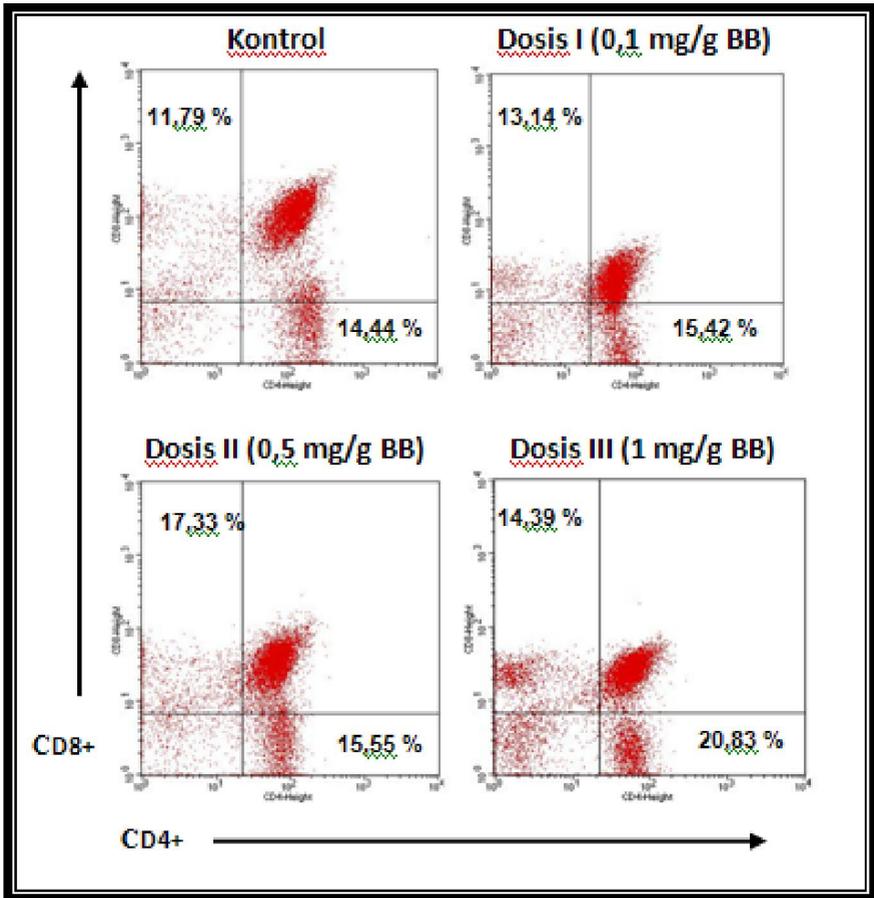


Gambar 4.4 Perbandingan Jumlah Relatif Sel T CD8⁺ ($p > 0,05$) (Dosis 1 = 0,1 mg/g BB, Dosis 2=0,5 mg/ g BB, Dosis 3= 1 mg/ g BB) pada organ *Spleen* dan Timus

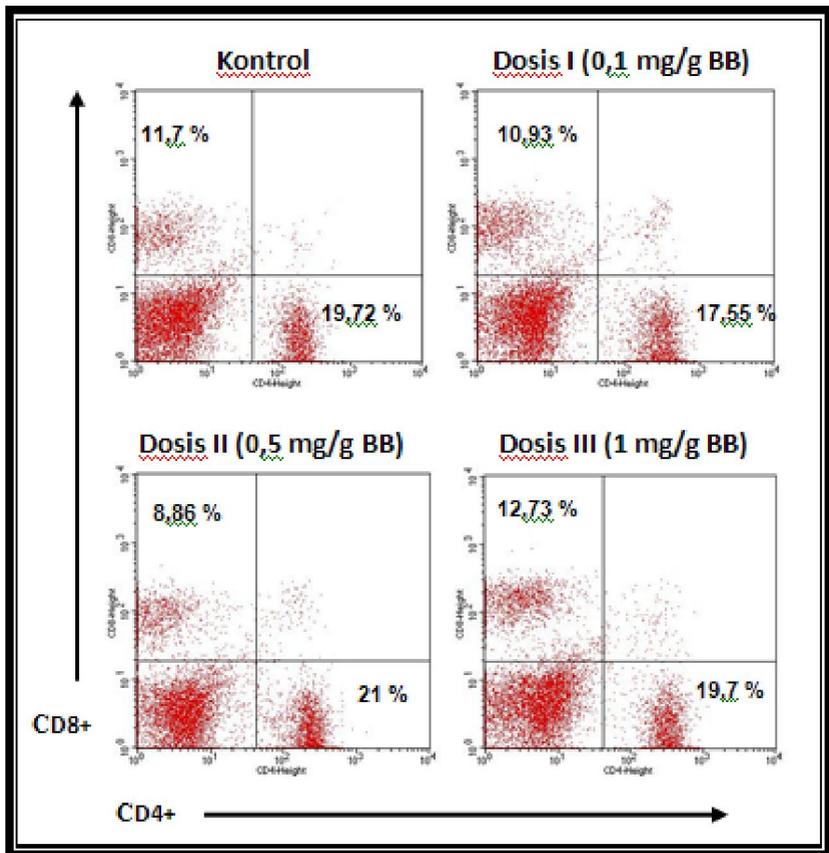
Perlakuan pemberian *crude* ekstrak umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) yang diberikan pada masing-masing mencit sehat tidak memberikan pengaruh yang signifikan atau berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap jumlah relatif sel T C CD8⁺ pada organ timus maupun organ *spleen*. Namun, berdasarkan gambar 4.4 dapat diketahui perbedaan jumlah relatif sel T CD8⁺ di setiap perlakuan pada organ timus maupun organ *spleen* walaupun tidak signifikan ($P > 0,05$). Jumlah relatif sel T CD8⁺ pada organ timus lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah relatif sel T CD8⁺ pada organ *spleen*.

Pemberian *crude* ekstrak umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) pada perlakuan dosis 2 (0,5 mg/ g BB) menunjukkan jumlah relatif sel T CD8⁺ pada organ timus paling tinggi dibandingkan dengan ketiga perlakuan lain yaitu 0,78 %. Sedangkan perlakuan kontrol memiliki jumlah relatif sel T CD8⁺ paling rendah yaitu 0,67 % (lampiran 13). Perlakuan dosis 3 (1 mg/ g BB) menunjukkan jumlah relatif sel T CD8⁺ pada organ *spleen* tertinggi dibandingkan dengan

ketiga perlakuan lain yaitu 0,72 % (lampiran 12). Sedangkan pada perlakuan dosis 2 (0,5 mg/ g BB) memiliki jumlah relatif sel T CD8⁺ paling rendah yaitu 0,6 % (lampiran 12).



Gambar 4.5 Profil Presentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada Organ Timus Disetiap Perlakuan Hasil Analisa Flowcytometry



Gambar 4.6 Profil Presentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada Organ *Spleen* Disetiap Perlakuan Hasil Analisa *Flowcytometry*

Perkembangan sel T CD4⁺ maupun CD8⁺ di dalam timus sangat ditentukan oleh adanya ketersediaan *self antigen* dan MHC yang diekspresikan oleh sel epitel dalam timus (Rifa'i, 2011). Subpopulasi limfosit T, limfosit T *helper* dan sel T sitotoksik memiliki peranan yang sama dalam mengeliminasi antigen asing yang masuk ke dalam tubuh seperti antigen tumor. Sel yang mengandung antigen

ganas akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I yang selanjutnya membentuk kompleks melalui TCR (*T-cell Receptor*) dari sel T sitotoksik (sel T CD8⁺) untuk mengaktivasi sel T sitotoksik yang berperan dalam menghancurkan sel ganas tersebut. CD8⁺ sitotoksik adalah efektor utama dalam mengeliminasi sel ganas, dengan cara mengenali dan membunuh sel yang mengekspresikan peptida yang berasal dari protein sel mutan atau protein virus onkogenik kemudian dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I (Kuby J, 1997). Sebagian sel-sel ganas seperti sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II sehingga dapat membentuk kompleks dengan limfosit T CD4⁺ (sel T *helper*) dan mengaktifkannya terutama subset Th1 yang berperan dalam mensekresi limfokin IFN- γ dan TNF- α . IFN- γ dan TNF- α dapat merangsang sel ganas sehingga dapat lebih banyak mengekspresikan molekul MHC kelas I yang berperan untuk mengoptimalkan sitotoksitas dari sel T- sitotoksik (sel T CD8⁺) (Sumarno, 2010).

Abbas *et.al.* (2000) mengatakan, CD8⁺ dibagi menjadi 2 yakni CD8⁺ supresor dan CD8⁺ sitotoksik yang memiliki tugas berlawanan. CD8⁺ supresor berfungsi untuk menekan sistem imun dan CD8⁺ sitotoksik untuk mengeliminasi sel yang mengalami keganasan. Jalur yang digunakan CD8⁺ sitotoksik adalah melalui granula eksositosis (perforin) yang dibentuk oleh sel limfosit dan gransim B sebagai komponen yang melisiskan sel tumor (apoptosis) (Zhanggou *et.al* 2002). Sel T CD8⁺ atau sitotoksik sel T (CTLs) berperan pada respons imun terhadap antigen virus pada sel yang diinfeksi dengan cara membunuh sel yang terinfeksi untuk mencegah penyebaran infeksi virus. Sel T *helper* (CD4⁺) adalah subset sel T yang berperan membantu sel B untuk memproduksi antibodi. Limfokin disekresikan oleh sel T untuk mempengaruhi dan mengaktivasi makrofag dan sel NK sehingga meningkat secara nyata pada penyerangan virus (Mayer, 2003). 5-10% sel T CD4⁺ terdapat pada sel T naïve mencit dan manusia, serta berperan penting dalam mengontrol respon imun. Sel T CD4⁺ mempunyai potensi menghasilkan sitokin yang mampu memacu aktivasi sel-sel yang lain (Liu *et.al.*, 2005).

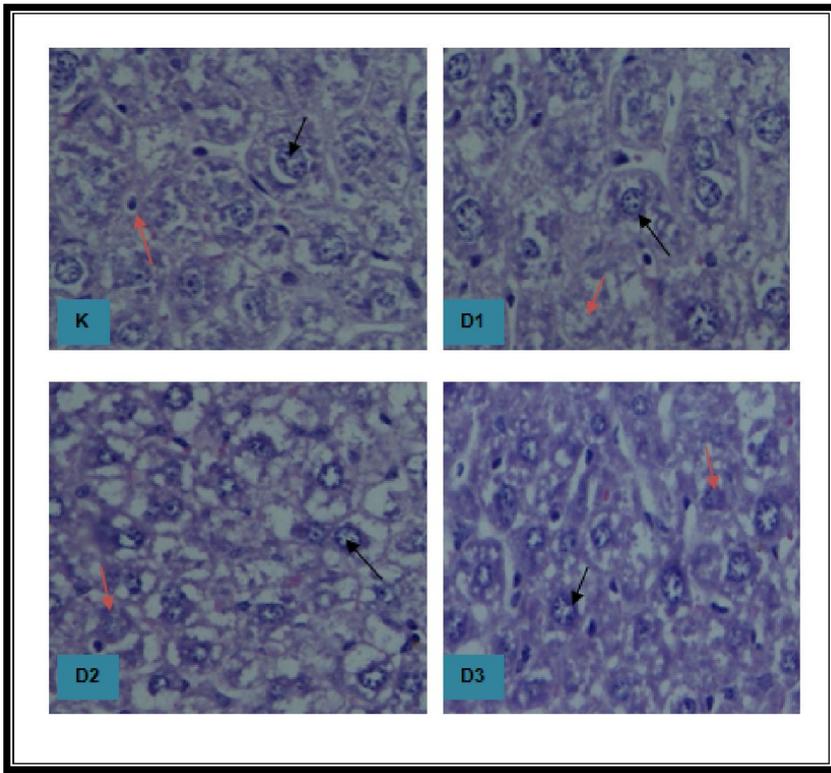
4.3 Analisis Histologi Hati Setelah Pemberian *Crude Ekstrak Umbi Sarang Semut (Hydnophytum formicarum Jack.)*

Hati sangat berperan penting didalam menampung, mengubah, dan mengeluarkan substansi toksik. Suatu senyawa apabila diberikan secara oral akan masuk ke dalam tubuh melalui saluran cerna, kemudian ditransformasikan ke sirkulasi portal hepatic dan dibawa langsung menuju hati sehingga hati rentan terhadap pengaruh adanya suatu zat yang masuk dalam jumlah relatif banyak dalam sirkulasi (Dewi, 2009).

Dosis yang berlebih dan pemasukan yang berulang ke dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan pada organ tubuh terutama hati. Kerusakan pada sel hepatosit dapat menyebabkan terjadinya perubahan struktur pada sel sehingga menimbulkan gangguan pada fungsi sel dalam metabolisme (Dewi, 2009).

Hepatosit dalam kondisi yang normal ditandai dengan nukleus terletak di bagian tengah, berbentuk heksagonal. Hepatosit normal mempunyai bentuk sel bulat, sel terlihat memiliki satu nukleus, namun ada juga yang memiliki lebih dari satu nukleus (binukleat) yang terdapat di tengah sel. Hati merupakan organ yang berperan dalam metabolisme berbagai macam nutrient yang diserap dari saluran cerna.

Hasil analisa pengaruh toksisitas pemberian *crude* ekstrak umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarum Jack.*) pada histologi hati mencit pada masing-masing kelompok perlakuan yaitu perlakuan kontrol, dosis 1 (0,1 mg/ g BB), dosis 2 (0,5 mg/ g BB) dan dosis 3 (1 mg/ g BB) (Gambar 4.7) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata atau bermakna pada setiap perlakuan. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap organ hepar pada mencit yang telah dilakukan *oral treatment* umbi sarang semut terdapat beberapa kerusakan pada bagian sel hepatosit di setiap kelompok perlakuan namun jumlah prosentase kerusakan yang terjadi tidak terlalu banyak. Kerusakan yang terjadi berupa gejala terjadinya degenerasi dan nekrosis yang tampak berupa perubahan inti yang piknotik, karioreksis dan kariolisis. Kerusakan yang terjadi tidak menunjukkan adanya *dose response relationship*.



Gambar 4.7 Struktur Histologi Hati (400x). Kontrol (K); Dosis 1(0,1 mg/ g BB); Dosis 2 (0,5 mg/ g BB); Dosis 3 (1 mg/ g BB); skala 30 μ m.

Beberapa penyebab sel mengalami kerusakan dapat disebabkan oleh bahan kimia, mikroorganisme, virus serta substansi atau agen lain yang berbahaya (Junqueira, 2005). Piknosis merupakan perubahan inti yang disebabkan oleh adanya denaturasi protein sel dan penurunan pH intrasel sehingga keadaan asam tersebut dapat menyebabkan kromatin terlipat atau menggumpal (Ngabekti, 2000). Kariolisis adalah inti sel yang mati selanjutnya akan menghilang sedangkan inti yang robek atau terbagi atas fragmen-fragmen disebut dengan karioreksis (Himawan, 1992).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Arif dkk. (2009) pada uji toksisitas tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap histologi organ hati mencit menyatakan bahwa umumnya pemberian dosis ekstrak air tanaman sarang semut tidak menimbulkan kelainan yang menyebabkan hewan sakit. Namun, ketika dosis ditingkatkan mulai tampak terjadi gangguan aktivitas dari unit fungsional organ hati yang menyebabkan terjadinya degenerasi pada bagian midzonal dan vakuola pada jaringan sel hati. Hal ini dapat disebabkan karena adanya bahan toksik yang relatif banyak masuk ke dalam hati sehingga mengganggu proses pencernaan. Akibatnya bahan nutrisi tertimbun dan menjadi racun bagi sel-sel dari hati sendiri (Hardy, 1983). Namun, pada hari ke- 12 timbul tanda-tanda terjadinya pleomorfik yaitu sel membentuk inti yang tidak seragam dan pada hari ke-19 penelitian sel-sel hati kembali normal. Sehingga kerusakan sel pada jaringan hati pada penelitian ini dimungkinkan dapat kembali menjadi normal apabila ditambahkan waktu pemberian *crude* ekstrak umbi tanaman sarang semut pada mencit.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

1. Pemberian *crude* ekstrak umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.) tidak dapat memberikan perubahan kuantitatif sel T killer CD8⁺ dan CD62L⁺ pada organ *spleen* secara signifikan. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya peningkatan maupun penurunan dari sel T CD8⁺CD62L⁺. Pemberian *crude* ekstrak umbi sarang semut secara oral pada mencit BALB/c normal juga tidak menunjukkan adanya interaksi dosis antara organ (*spleen* dan timus) yang signifikan. Jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan pada setiap organ dan masing-masing dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan.
2. Histopatologis hepar mencit BALB/c normal akibat pemberian *crude* ekstrak umbi tanaman sarang semut secara oral tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada organ hepar di setiap kelompok perlakuan.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah :

1. Penting dilakukan penambahan kontrol positif pada penelitian selanjutnya sehingga dapat diketahui perbedaan maupun pengaruh yang ditimbulkan pada sel-sel limfosit
2. Penting dilakukan peningkatan dosis pada penelitian selanjutnya yang bertujuan untuk lebih mengetahui efektivitas dari *crude* ekstrak umbi sarang semut (*Hydnophytum formicarum* Jack.)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas K. A, A.H Lichtman, and J.S Pober. 2000. Celluler and Moleculer Immunology. Fourth Edition. W.B. Saunders Company. California.
- Albab, F. A. 2009. Perubahan Kuantitatif Interleukin 4, Sel B220+ dan Sel T CD4+ Sumsum Tulang Serta Histopatologi Hati Mencit BALB/c Splenectomy Pasca Paparan Salmonella typhi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
- Allen, S.E. 2002. The Liver: Anatomy, Physiology, Disease and Treatment. Northeastern University.
- Baratawidjaja, K. 2006. Sistem Imun. Dalam: Imunologi Dasar. Edisi 7. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.
- Dewi, K. U dan T. Rini. 2009. Efek Rebusan Daun Tapak Dara pada Dosis dan Frekuensi yang Berbeda terhadap Kerusakan dan Akumulasi Glikogen pada Hepar Mencit (*Mus musculus*). BIOMA. Vol. 11, No.1. Hal. 1-5.
- Hagerman, A.E. 2002. Condensed Tannin Structural Chemistry. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, Oxford.
- Harun, N. dan W. Syari. 2002. Aktivitas antioksidan ekstrak daun dewa dalam menghambat sifat hepatoksik halotan dengan dosis sub anastesi pada mencit. *J. sains dan Teknologi Farmasi*, 7:63-70.
- Himawan S. 1992. Kumpulan Kuliah Patologi. UI Press. Jakarta
- Junqueira, L., and C.J. Carneiro. 2005. Basic Histology, text and atlas edition 11th. McGraw-Hill's. New York.
- Kelly, J. 2007. Understanding the Immune System How It Works. www.Niaid.nih.gov. NIH Publication No. 07-5423.
- Mader, S.S. 2004. Understanding Human Anatomy & Physiology, Fifth Edition. McGraw-Hill's. New York.
- Meijers, R., C. C. Lai, Y. Yang, J. H., Liu, W. Zhong, J. H. Wang, and E.L. Reinherz. 2005. *J. Mol. Biol.* 345, 1099-1110.
- Middleton, E., J. C. Kandaswami, and T. C. Theoharides. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*. *Pharmacol Rev* 52:673-751, Vol. 52, No. 4.

- Ngabekti dan Isnaeni. 2000. Pemanfaatan Kurkumin Untuk Mengeliminir Pengaruh Diazonin terhadap Kerusakan Hati Mencit (*Mus musculus* L). Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Plantamor. 2011. Klasifikasi *Hydnophytum formicarum* Jack. . <http://www.plantamor.com/index.php?plant=2165> Tanggal akses 30 Mei 2011.
- Prachayasittikul, S., P. Buraparungsang., A. Worachartcheewan, C. Isarankura-Na-Ayudhya, S. Ruchirawat and V. Prachayasittikul. 2008. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules*, 13:904-921.
- Pramono, E. 1999. Pemberdayaan, Penggunaan Obat Asli Indonesia dalam menunjang Sistem Kesehatan Nasional. Indofarma. Jakarta.
- Rahman, M. 2006. Introduction to Flow Cytometry. Serotec Ltd. UK
- Rifa'I, M. 2011. Alergi dan Hipersensitif. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
- School of medicine. 2006. Flow Cytometry and fluorescence- Activated CellSorting(FACS).Missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/flow.htm. Tanggal akses 15 Juni 2011.
- Schwaiger, S., A. M. Wolf, P. Robatscher, B. Jenewein and B. Grubeck-Loebenstein. 2003. IL-4-Producing CD8⁺ T Cells with a CD62L^{++(bright)} Phenotype Accumulate in a Subgroup of Older Adults and Are Associated with the Maintenance of Intact Humoral Immunity in Old Age. *J Immunol* 170;613-619.
- Soeksmanto, A., P. Simanjuntak dan M.A. Subroto. 2009.Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) Terhadap Histologi Organ Hati Mencit. *Jurnal Natur Indonesia*.
- Soeksmanto, A., M.A. Subroto, H. Wijaya and P. Simanjuntak, 2010. Anticancer activity for extracts of Sarang-Semut plant (*Myrmecodia pendens*) to HeLa and MCM-B2 cells. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 13: 148-151.
- Subroto, MA dan H. Saputra. 2006. Gempur Penyakit dengan Sarang Semut. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Succulent.2011.www.succulentplant.com/families/rubiaceae/p1000267.jpg Tanggal akses 19 Oktober 2011.

- Sumarno. 2010. Pengaruh Ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia pendens* Merr.&Perry) terhadap Aktivitas Proliferasi sel dan Indeks Apoptosis Kanker Payudara Mencit CH3. Tesis. Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I patologi Anatomi. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Tazulakhova EB, O.V. Parshina, T.S. Guseva, F.I. Ershov. 2001. Russian experience in screening, analysis, and clinical application of novel interferon inducers. J Interferon Cytol:ine Res.
- Tedder, T.F., D.A. Steeber, A. Chen, and P. Engel. 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. FASEB J. 9, 866–873.
- Thomas C. Wirth, Vladimir P. Badovinac, Lichao Zhao, Morris O. Dailey and John T. Harty.2009. Differentiation of Central Memory CD8 T Cells Is Independent of CD62L-Mediated Trafficking to Lymph Nodes. 2009;182;6195-6206 J Immunol.
- Xu, J., I.S. Grewal, G.P. Geba, and R.A. Flavell. 1996. Impaired primary T cell responses in L-selectin-deficient mice. J. Exp. Med.183, 589–598.
- Zhonggou Yi, Xue Ke,Xue Yuan, Xue Bao, 2002. abstract: Killing cell by granzyme.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 91-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : PERUBAHAN KUANTITATIF SEL T KILLER CD8⁺ PADA
MENCIT BALB/c (*Mus musculus*) SETELAH PEMBERIAN
CRUDE EKSTRAK TANAMAN SARANG SEMUT
(*Hydnophytum formicarum* JACK)

PENELITI : NINING SETIAWATI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : S1-BIOLOGI/F-MIPA/UNIVERSITAS BRAWIJAYA

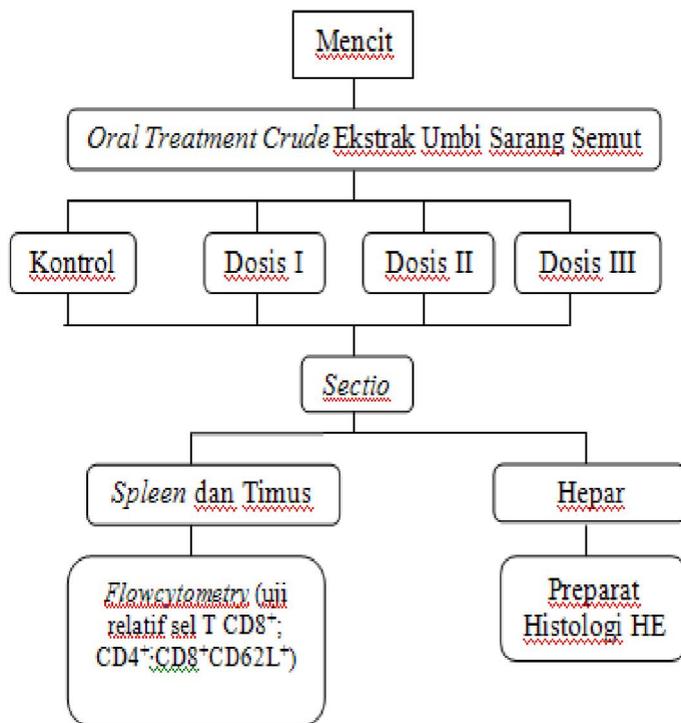
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 24 Juli 2012
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof.Dr.drh. Aulann'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian



Lampiran 3. Komposisi Larutan

Tabel 1. Komposisi Bahan *Phosphate Buffer Saline* (PBS)

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	NaCl	3.8 gram
2.	Na ₂ HPO ₄	0.55 gram
3.	NaH ₂ PO ₄	0.35 gram
4.	Akuades	Sampai 1 liter

Tabel 2. Komposisi Bahan *Paraformal dehyde* 4 % (PFA)

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	PFA	4 gram
2.	PBS	150 ml
3.	NaOH	

Lampiran 4. Persiapan Pembuatan *Crude* Ekstrak Umbi Sarang Semut

Umbi sarang semut

- dicuci dan dipotong kecil-kecil
- dikeringkan di bawah sinar matahari
- dihaluskan

Bubuk sarang semut

- disimpan pada suhu ruang
- ditambahkan air hangat
- dihomogenasi selama 5 menit

Larutan *crude* ekstrak sarang semut

- diberikan secara oral (sonde) pada mencit (0,1 mg/g BB (dosis I), 0,5 mg/g BB (dosis II) dan 1 mg/g BB (dosis III))
- Perlakuan secara oral pada mencit dilakukan selama 2 minggu atau 14 hari pada pagi dan sore hari

Hasil

Lampiran 5. Penghitungan Konsentrasi Cekok Umbi Sarang Semut

Contoh perhitungan volume *crude ekstrak* umbi sarang semut untuk mencit dengan berat badan 30 g.

Diketahui:

Konsentrasi *crude ekstrak* umbi sarang semut dalam larutan stok:

4mg/ml (stok 1), 20 mg/ml (stok 2), 40 mg/ml (stok 3)

Dosis 1 *crude ekstrak* umbi sarang semut: 0.1 mg/g BB

Dosis 2 *crude ekstrak* umbi sarang semut: 0.5 mg/g BB

Dosis 3 *crude ekstrak* umbi sarang semut: 1 mg/g BB

Perhitungan dosis yang dicekakkan:

Dosis 1 *crude ekstrak* umbi sarang semut: 0.1 mg/g BB

$$\frac{30 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 0.1 \text{ mg} = 3 \text{ mg}$$

$$\frac{3 \text{ mg}}{4 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0.75 \text{ ml} = 750 \mu\text{l}$$

Volume *crude ekstrak* umbi sarang semut yang dioralkan = 750 μl

Dosis 2 *crude ekstrak* umbi sarang semut: 0.5 mg/g BB

$$\frac{30 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 0.5 \text{ mg} = 15 \text{ mg}$$

$$\frac{15 \text{ mg}}{20 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0.75 \text{ ml} = 750 \mu\text{l}$$

Volume *crude ekstrak* umbi sarang semut yang dioralkan = 750 μl

Dosis 3 *crude ekstrak* umbi sarang semut: 1 mg/g BB

$$\frac{30 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 1 \text{ mg} = 30 \text{ mg}$$

$$\frac{30 \text{ mg}}{40 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0.75 \text{ ml} = 750 \mu\text{l}$$

Volume *crude ekstrak* umbi sarang semut yang dioralkan = 750 μl

Lampiran 6. Isolasi *Spleen* dan Timus Serta Penghitungan Sel Hidup

Spleen dan Timus

- diambil dari tubuh mencit yang telah disectio
- dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali
- setiap organ diletakkan dalam cawan petri yang berisi 5 ml PBS
- dipencet dengan pangkal spuit searah jarum jam
- disaring dengan *wire*
- dimasukkan pada tabung propilen BD nylon cell stainer™ 1000 μm
- diresuspensi dengan 10 ml PBS
- dimasukkan dalam tabung propilen
- disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit

Pelet

- dimasukkan pada microtube baru, ditambahkan 500 μl PBS
- disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 3 menit
- disimpan pada suhu 4°C
- diresuspensi dengan 1 ml PBS

Analisa *Flowcytometry*

- diambil 5 μl
- dimasukkan dalam 95 μl *Tryphan Blue*
- dihitug sel hidup menggunakan *haemocytometer*

Hasil

Lampiran 7. Analisa *Flowcytometry*

50 µl Pelet

- dimasukkan dalam tabung effendorf berisi 1 ml PBS
- disentrifugasi 3500 rpm, 2 menit, 4°C

Pelet

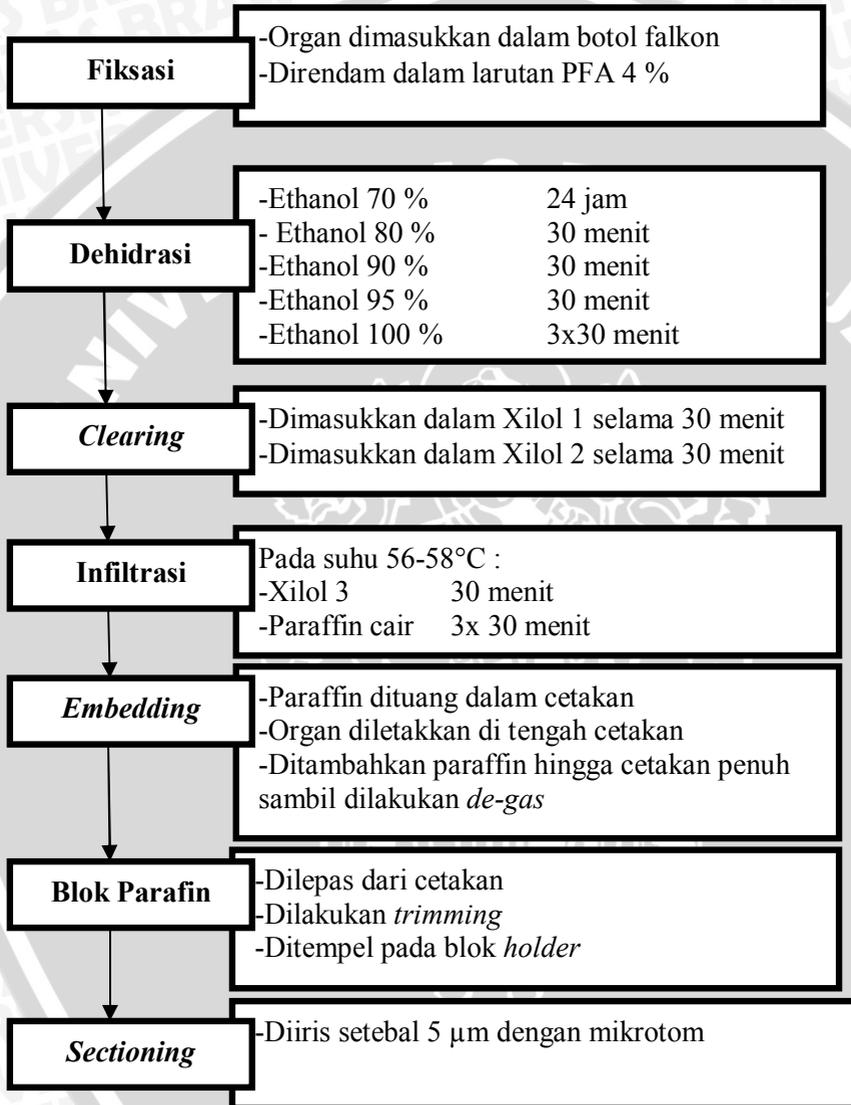
- diinkubasi dengan antibodi anti CD8⁺CD62L pada *spleen*, antibodi anti CD4⁺CD8⁺ pada *spleen* serta antibodi anti CD4⁺CD8⁺ pada timus selama 15 menit

Pelet (*coating antibodi*)

- diambil dan dimasukan dalam kuvet *flowcytometer*
- ditambah 1000 µl PBS steril
- kuvet dipasang pada *nozzle* BD FACSCaliburTM *flowcytometer*
- dilakukan setting computer dengan software BD Cell Quest ProTM
- dilakukan koneksi computer dengan *flowcytometer*
- dirunning larutan dalam *nozzle flowcytometer*

Hasil

Lampiran 8. Pembuatan Preparat dengan Pewarnaan HE (Albab, F.A. 2009)



Pita Irisan

- Diambil dengan kuas
- Diletakkan dalam air hangat 38-40°C dalam *water bath*
- Diambil dengan gelas objek hingga menempel di atasnya
- Gelas objek diletakkan diatas hotplate dan dikeringkan

Deparafinasi

- Dideparafinasi dalam Xilol sebanyak 2x 10 menit
- Direhidrasi dalam ethanol bertingkat (EtOH abs, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 30% @5 menit)
- Dicuci dengan akuades mengalir selama 5 menit

Hematoksilen

- Direndam dalam hematoksilen selama 10 detik
- Dicuci dengan akuades mengalir selama 5 menit
- Direndam dalam ethanol bertingkat (30%, 60%, 70%, @ 5 menit)

Eosin

- Direndam dalam eosin selama 10 menit
- Direhidrasi dalam ethanol bertingkat (70%, 60%, 30%, @5 menit)
- Diclearing dengan xilol selama 3x5 menit
- Mounting dengan enthelan

**Lampiran 9. Jumlah Relatif Sel T CD8⁺CD62L⁺ pada Organ
Spleen Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah Relatif sel T CD8CD62L
N		12
Normal Parameters ^a	Mean	4.4158
	Std. Deviation	1.69675
Most Extreme Differences	Absolute	.206
	Positive	.206
	Negative	-.148
Kolmogorov-Smirnov Z		.712
Asymp. Sig. (2-tailed)		.691

a. Test distribution is Normal.

Descriptives

Jumlah Relatif sel T CD8CD62L

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	4.3633	2.20629	1.27380	-1.1174	9.8441	3.03	6.91
Dosis 1 (0,1 mg/g BB)	3	4.5500	1.75419	1.01278	.1923	8.9077	3.41	6.57
Dosis 2 (0,5 mg/g BB)	3	4.3300	2.44178	1.40976	-1.7357	10.3957	2.00	6.87
Dosis 3 (1 mg/g BB)	3	4.4200	1.37292	.79265	1.0095	7.8305	3.14	5.87
Total	12	4.4158	1.69675	.48981	3.3378	5.4939	2.00	6.91

Lampiran 10. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (*One-way two factor*) Interaksi Antara Organ (*Spleen* dan *Timus*) dan Dosis Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlahrelatif

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.100 ^a	7	.014	.922	.515
Intercept	18.215	1	18.215	1.178E3	.000
Organ	.034	1	.034	2.198	.158
Dosis	.033	3	.011	.720	.555
Organ * Dosis	.032	3	.011	.699	.566
Error	.247	16	.015		
Total	18.563	24			
Corrected Total	.347	23			

a. R Squared = .287 (Adjusted R Squared = -.024)



Lampiran 11. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (*One-way two factor*) Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ pada Organ *Spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.

Descriptives

Jumlahrelatif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol	3		
Dosis 1	3	.8568	.16432	.09487	.4486	1.2650	.68	1.01
Dosis 2	3	.9473	.14826	.08560	.5790	1.3156	.84	1.12
Dosis 3	3	.9113	.17905	.10337	.4665	1.3561	.71	1.04
Total	12	.9088	.12793	.03693	.8275	.9901	.68	1.12

ANOVA

Jumlahrelatif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.013	3	.004	.207	.889
Within Groups	.167	8	.021		
Total	.180	11			

Lampiran 12. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (*One-way two factor*) Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ pada Organ Timus Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.

Descriptives

Jumlahrelatif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol	3		
Dosis 1	3	.8027	.11869	.06852	.5078	1.0975	.69	.92
Dosis 2	3	.8042	.14152	.08171	.4526	1.1558	.65	.93
Dosis 3	3	.9473	.04892	.02824	.8258	1.0688	.90	1.00
Total	12	.8335	.11008	.03178	.7636	.9035	.65	1.00

ANOVA

Jumlahrelatif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.053	3	.018	1.753	.234
Within Groups	.080	8	.010		
Total	.133	11			

Lampiran 13. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (*One-way two factor*) Jumlah Relatif Sel T CD8⁺ pada Organ Spleen Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.

Descriptives

Jumlahrelatif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	.6903	.14092	.08136	.3402	1.0404	.56	.84
Dosis 1	3	.6669	.12959	.07424	.3474	.9863	.53	.79
Dosis 2	3	.6004	.09125	.05268	.3737	.8270	.54	.70
Dosis 3	3	.7209	.15043	.08685	.3473	1.0946	.55	.83
Total	12	.6696	.11996	.03463	.5934	.7458	.53	.84

ANOVA

Jumlahrelatif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.024	3	.008	.467	.713
Within Groups	.135	8	.017		
Total	.158	11			

Lampiran 14. Hasil Uji Analisa RAL Faktorial (*One-way two factor*) Jumlah Relatif Sel T CD8⁺ pada Organ Timus Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.

Descriptives

Jumlahrelatif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	.6705	.27271	.15745	-.0069	1.3480	.40	.95
Dosis 1	3	.7256	.20973	.12108	.2046	1.2466	.52	.94
Dosis 2	3	.7970	.46251	.26703	-.3519	1.9460	.44	1.32
Dosis 3	3	.7768	.06014	.03472	.6274	.9262	.71	.82
Total	12	.7425	.25238	.07285	.5821	.9028	.40	1.32

ANOVA

Jumlahrelatif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.029	3	.010	.115	.949
Within Groups	.672	8	.084		
Total	.701	11			