

**Uji Efektivitas VipAlbumin[®] terhadap penurunan Kadar
Glukosa Darah dan Profil Sel Limfosit T pada mencit Balb/c
model Diabetes Melitus Tipe 2**

SKRIPSI

**Oleh :
GANYS TRI SILVANA
115090107111020**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

**Uji Efektivitas VipAlbumin® terhadap penurunan Kadar Glukosa
Darah dan Profil Sel Limfosit T pada mencit Balb/c model Diabetes
Melitus Tipe 2**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjan Sains dalam bidang Biologi**

**Oleh :
GANYS TRI SILVANA
115090107111020**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI
Proposal Skripsi berjudul “Uji Efektivitas VipAlbumin® terhadap
penurunan Kadar Glukosa Darah dan Profil Sel Limfosit T pada
mencit Balb/c model Diabetes Melitus Tipe 2”

Oleh :
Ganys Tri Silvana
115090107111020

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 23 Januari 2015
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Disetujui oleh:
Pembimbing I

Muhaimin Rifai'i, S.Si., Ph.D., Med.Sc
NIP. 1968062-199702-1-001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., Magr.Sc., Ph.D.
NIP. 19700128-199412-2-001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ganys Tri Silvana
NIM : 115090107111020
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul :

Uji Efektivitas VipAlbumin® terhadap penurunan Kadar Glukosa Darah dan Profil Sel Limfosit T pada mencit Balb/c model Diabetes Melitus Tipe 2

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 tertulis di daftar pustaka dalam skripsi
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil plagiat, maka saya bersedia mananggung segala resiko apapun yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 Januari 2015
Yang menyatakan,

Ganys Tri Silvana
NIM. 115090107111020

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.



Uji Efektivitas VipAlbumin[®] terhadap Penurunann Kadar Glukosa Darah dan Profil Sel Limfosit T pada mencit Balb/C model Diabetes Melitus tipe 2

Ganys Tri Silvana

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya

Abstrak

Diabetes melitus (DM) memiliki prevalensi yang cenderung meningkat dari tahun ke tahun sehingga dibutuhkan obat yang efektif dan ekonomis untuk menanggulangnya. VipAlbumin[®] memiliki kandungan antioksidan yang tinggi, sehingga dapat dijadikan sebagai terapi Diabetes yang efektif dan ekonomis. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh VipAlbumin[®] Ikan Gabus (*Channa striata*) dalam menurunkan kadar glukosa darah dan kuantitatif sel T $CD4^+$, $CD8^+$, dan $CD4^+CD62L^+$, $CD8^+CD62L^+$ dan SDF-1. Hewan uji yang digunakan adalah 25 ekor mencit jantan, berumur 5 hari di injeksi *Streptozotocin* dalam 1 ml larutan *buffer* sitrat, dosis 100 mg/kg BB. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok (mencit Normal, mencit injeksi STZ, D1, D2 dan D3). Setelah 3 minggu diperiksa kadar Glukosa Darah dan di injeksi oral dengan VipAlbumin[®] selama 15 hari. Selanjutnya dilakukan isolasi sel Limfosit dan di lihat profil sel T $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD62L^+$, $CD8^+CD62L^+$ dan SDF-1 melalui analisis *flowcytometry*. Data yang diperoleh kemudian di analisis ANOVA dengan signifikasi 0,05% pada SPSS. VipAlbumin[®] memicu aktivitas imunokompeten mencit model DM tipe 2. Hal ini diketahui melalui peningkatan jumlah sel T $CD4^+CD62L^+$ sebesar 58,89 %, sel T $CD8^+CD62L^+$ sebesar 59,45 % dan SDF-1 sebesar 10,28 % (dosis 10,4 mg/g BB) setelah injeksi STZ. Jumlah sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$ menurun signifikan pada dosis D3. Dosis yang efektif untuk penurunan gula darah pada mencit DM tipe 2 adalah pada D3.

Kata kunci : Diabetes Mellitus tipe 2, *Flowcytometry*, Limfosit, *Streptozotocin*, VipAlbumin[®].

Activity Test of VipAlbumin® against Blood Glucose Levels and Lymphocytes in Balb/c mice as Type 2 Diabetes Mellitus model

Ganys Tri Silvana, Muhaimin Rifa'i

Biology Department, Faculty of Mathematic an Natiral Science,
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) has a prevalence to increase every year, so we need an effective and economical drugs to cope. VipAlbumin® high antioxidant content, so it can be used as an effective diabetes therapy and economical. The purpose of this study to understand about the effect VipAlbumin® Cork Fish (*Channa striata*) in lowering blood glucose levels and quantitative changes of T cells $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD62L^+$, $CD8^+CD62L^+$, and $SDF-1^+$. Test animals used were 25 male mice, aged 5 days in Streptozotocin injection in 1 ml of citrate buffer solution, a dose of 100 mg/kg BB. Mice were divided into 5 groups (Normal mice, rats STZ injection, D1, D2 and D3). After 3 weeks examined levels of blood glucose and oral injection with VipAlbumin® for 15 days. Further lymphocyte cell isolation and in view profiles of T cells $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+CD62L^+$, $CD8^+CD62L^+$, and $SDF-1^+$ through flowcytometry analysis. The data obtained and ANOVA analysis with significance at 0.05% on SPSS. VipAlbumin® trigger activity immunocompetent mice model of diabetes mellitus type 2. It is known through an increase in the number of $CD4 + T$ cells by 58.89% $CD62L +$, $CD8 + T$ cells by $CD62L +$ 59.45% and $SDF-1$ at 10.28% (10.4 dose mg/g BB) after STZ injection. The number of $CD4 + T$ cells and $CD8 +$ decreased significantly in a dose of D3. Effective dose to decrease blood sugar in mice with type 2 diabetes is on the D3.

Keyword : Diabetes Mellitus type 2, Flowcytometry, Lymphocytes, Streptozotocin, VipAlbumin®.

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan baik. Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini tidak dapat terselesaikan tanpa bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak Muhaimin Rifa'i, S.Si., PhD., Med.Sc selaku dosen pembimbing yang selalu memberikan dukungan dan bimbingannya dalam penelitian maupun penulisan skripsi.
2. Bapak Sasmito Djati dan Bapak Aris Soewondo sebagai Dosen penguji yang telah memberikan banyak saran masukan untuk perbaikan skripsi ini.
3. Mama dan Papa yang selalu memberikan doa dan dukungannya sepanjang waktu.
4. Ardiony Kharismawanto yang selalu memberi semangat selama kegiatan penelitian dan penyelesaian penulisan skripsi.
5. Mbak Dina Rizki, S.Si, Mas Andi Rizky, S.Si selaku team penelitian yang selalu membantu selama penelitian berlangsung.
6. Ulfa Maulida Rahma yang sudah membantu dan menemani selama penulisan skripsi ini.
7. Para sahabat yang telah memberikan dukungan semangat dan moril untuk penulis sehingga kegiatan penelitian skripsi ini menjadi lebih ringan.

Dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu, saran dan kritik sangat dibutuhkan untuk penulisan yang lebih baik dan dapat memberikan manfaat yang besar bagi para pembaca.

Malang, 20 Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan.....	3
1.4. Manfaat.....	3
1.4.1. Manfaat di bidang akademik	3
1.4.2. Manfaat di bidang penelitian	3
1.4.3. Manfaat di bidang pelayanan medik.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Sistem imunitas tubuh	4
2.2. Spleen	5
2.3. Sel Limfosit T.....	6
2.4. Albumin Ikan Gabus.....	7
2.5. Glukosa Darah.....	8
2.6. Diabetes Melitus Tipe 2.....	9
2.7. Insulin.....	10
2.8. <i>Streptozotocin (STZ)</i>	10
2.9. <i>Flow cytometri</i>	12
BAB III METODE PENELITIAN.....	14
3.1. Waktu dan tempat.....	14
3.2. Alat dan Bahan	14
3.3. Kegiatan Penelitian.....	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1. Analisis jumlah total sel T CD4 ⁺	18
4.2. Analisis jumlah total sel T CD8 ⁺	19
4.3. Analisis jumlah total sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺	22

4.4. Analisis jumlah total sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺	24
4.5. Analisis jumlah total SDF-1	25
4.6. Analisis kadar gula darah.....	28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
5.1. Kesimpulan.....	30
5.2. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar

2.1.	Respon sistem imun	5
2.2.	VipAlbumin.....	8
2.3.	Struktur kimia <i>Sreptozotocin</i>	11
2.4.	Prinsip kerja <i>flow cytometer</i>	13
4.1	Jumlah relatif sel T CD4 ⁺ pada <i>spleen</i>	18
4.2	Jumlah relatif sel T CD8 ⁺ pada <i>spleen</i>	20
4.3	Presentase jumlah sel T CD4 ⁺ dan sel T CD8 ⁺ pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal <i>STZ</i>	21
4.4	Jumlah relatif perbandingan sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ dan sel T CD4 ⁺ CD62L ⁻ pada <i>spleen</i>	22
4.5	Presentase jumlah sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ di spleen pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal <i>STZ</i>	23
4.6	Jumlah relatif perbandingan sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ dan sel T CD8 ⁺ CD62L ⁻ pada <i>spleen</i>	24
4.7	Presentase jumlah sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal <i>STZ</i>	25
4.8	Jumlah relatif SDF-1 pada hepar.....	26
4.9	Presentase jumlah total SDF-1 pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal <i>STZ</i>	27
4.10	Jumlah rata-rata penurunan glukosa darah	28



DAFTAR TABEL

Tabel

LT1. Hasil Uji Normalitas	36
LT2. Hasil analisis ragam ANOVA uji Homogenitas melalui softwre SPSS 16.0 for Windows	37
LT3. Hasil analisis ANOVA	38
LT4. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD4 ⁺	38
LT5. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD8 ⁺ pada organ <i>lymph node</i>	39
LT6. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD62L ⁺ dan CD4 ⁺ CD62L ⁻ pada organ <i>lymph node</i> melalui.....	39
LT7. Hasil analisis jumlah relatif sel T CD4 ⁺ CD62L ⁻	40
LT8. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD8 ⁺ CD62L ⁺ dan CD8 ⁺ CD62L ⁻ pada organ <i>lymph node</i>	40
LT9. Hasil analisis jumlah relatif sel T CD8 ⁺ CD62L ⁻	41
LT10. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif SDF-1 pada organ hepar yang sudah di transformasi	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Sertifikat Laik etik..... 35
2. Hasil Uji Normalitas.....36
3. Hasil analisis ragam ANOVA uji Homogenitas melalui softwre SPSS 16.0 for Windows37
4. Hasil analisis ANOVA melalui softwre SPSS 16.0 for Windows38
5. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD4⁺38
6. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD8⁺ pada organ *lymph node*39
7. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD4⁺CD62L⁺ dan CD4⁺CD62L⁻ pada organ *lymph node* melalui39
8. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD8⁺CD62L⁺ dan CD8⁺CD62L⁻ pada organ *lymph node*40
9. Hasil analisis uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif SDF-1 pada organ hepar yang sudah di transformasi41

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan/ Simbol

APC	: <i>Antigen-presenting cell</i>
DM	: <i>Diabetes Melitus</i>
CD	: <i>Cluster of differentiation</i>
FITC	: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GALT	: <i>Gut associated lymphoid tissue</i>
HSD	: <i>High significant</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
MHC	: <i>Mayor hystocompatibility complex</i>
PBS	: <i>Posphat buffer saline</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>
Th	: <i>T helper</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah suatu kelainan metabolik kronis yang berdampak signifikan terhadap kesehatan seseorang, kualitas hidup, harapan hidup dan pada sistem layanan kesehatan. DM merupakan penyakit metabolik dengan kondisi dimana konsentrasi glukosa dalam darah secara kronis lebih tinggi daripada nilai normal (hiperglikemia) yang terjadi karena kelainan sekresi insulin atau kelainan kerja insulin sehingga fungsi insulin tidak efektif. Diabetes melitus bisa disebabkan oleh destruksi sel beta pankreas karena proses autoimun. Jumlah penderita diabetes di Indonesia juga semakin meningkat setiap tahunnya. Badan Kesehatan Dunia (World Health Organization/ WHO) memperkirakan jumlah penderita DM tipe 2 di Indonesia akan meningkat hingga pada 2030 mencapai 21,3 juta orang (Cahyafitri, 2010).

Penanggulangan Diabetes Melitus tipe 2 meliputi dua pendekatan, yaitu pendekatan tanpa obat (diet makanan rendah karbohidrat) dan pendekatan dengan obat. Pendekatan tanpa obat dilakukan dengan cara pengaturan pola makanan dan latihan jasmani, sedangkan pendekatan dengan obat dilakukan dengan terpai insulin. Pola makan modern seperti sekarang yang tidak sehat, disertai intensitas makan yang tinggi dan stres yang menekan sepanjang hari, membuat kadar glukosa darah sulit dikendalikan (Santoso, 2001).

Penderita DM sering terjadi komplikasi pada pembuluh darah berupa makroangiopati, mikroangiopati, neuropati, penurunan daya tahan tubuh sehingga memudahkan terjadinya infeksi, inflamasi, iskemia dan kematian sel (Masharani, *et al*, 2004). Adanya proses autooksidasi pada hiperglikemi dan reaksi glikasi ini memicu pembentukan radikal bebas. Radikal bebas dapat merusak membran sel menjadi lipid peroksida atau malondialdehid (MDA), bila berkelanjutan mengakibatkan kerusakan sistem membran sel dan kematian sel (Baynes, 1991). Jaringan atau sel yang sangat rentan terhadap radikal bebas adalah eritrosit, limfosit, fibroblas, sel tumor, endotel, liposome dan mitokondria. Dengan demikian sel T (sel imun) sangat rentan mengalami inflamasi (Waspadji, S. 2000).

Masuknya antigen dalam tubuh mengakibatkan reaksi imun yang sangat kompleks. Respon imun dibedakan menjadi dua yaitu respon

imun seluler dan humoral. Kedua macam respon imun ini tidak dapat dipisahkan satu dengan lainnya. Respon yang terjadi pada umumnya merupakan gabungan dari kedua macam respons tersebut. Set T *helper* CD4⁺ juga membantu sel B memproduksi antibodi. Dalam menjalankan fungsinya, sel T harus berinteraksi dengan sel lain seperti fagosit, sel yang terinfeksi, atau sel B (Hori, dkk., 2003).

Biaya pengobatan DM relatif cukup mahal, sehingga saat ini mulai dikembangkan pengobatan alternatif dengan menggunakan obat herbal. Selain harganya yang terjangkau, obat herbal juga memiliki efek samping yang relatif kecil. Di antara 250.000 spesies tanaman obat di seluruh dunia diperkirakan banyak yang mengandung senyawa anti-DM yang belum diketemukan. Penelitian menunjukkan bahwa albumin ikan gabus mempunyai banyak khasiat bagi kesehatan. Albumin ikan gabus memiliki kualitas jauh lebih baik dari albumin telur. Ikan gabus sendiri mengandung 6,2 % albumin dan 0,00174 % Zn dengan asam amino esensial yaitu treonin, valin, metionin, isoleusin, leusin, fenil alanin, lisin, histidin dan angini serta asam amino non esensial seperti asam aspartat, serin asam glutamat, glisin, alanin, sistein, tiroksin, hidroksilin, amonia, hidroksiprolin dan prolin. Aktivitas antioksidan ekstrak ikan gabus 84.66 atau sebanding dengan 93.44 5 aktivitas antioksidan vitamin E. Dalam penelitian ini, hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*). Mencit memiliki kesamaan fisiologis dengan manusia, siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak setiap kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan penanganannya mudah. Selain itu, sifat anatomis dan fisiologis mencit terkarakterisasi dengan baik (Rosa, 2004). Oleh sebab itu penelitian ini penting dilakukan untuk mengkonfirmasi dan mengetahui adanya pengaruh ekstrak albumin ikan gabus yang dikemas dalam bentuk kapsul VipAlbumin® karena dari aktivitas kandungan tersebut ekstrak albumin ikan gabus dapat digunakan untuk terapi DM dan mengetahui perubahan kuantita sel T.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan yang dapat dikaji dalam penelitian ini, yaitu :

1. Apakah pemberian VipAlbumin ikan gabus (*Channa striata*) dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit Balb/c yang diinduksi *Streptozotocin* ?
2. Bagaimana perubahan kuantitatif sel T CD4⁺, CD8⁺, dan CD4⁺CD62L⁺, CD8⁺CD62L⁺ pada organ spleen dan SDF-1 pada organ hpar?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh VipAlbumin Ikan Gabus (*Channa striata*) dalam menurunkan kadar glukosa darah Mencit induksi *Streptozotocin*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian VipAlbumin ikan gabus (*Channa striata*) terhadap perkembangan Limfosit T.

1.4 Manfaat

Manfaat yang didapatkan setelah melakukan penelitian ini adalah :

1. Manfaat di Bidang Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah dan memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh ekstrak albumin ikan gabus (*Channa striata*) terhadap kadar glukosa darah pada penderita Diabetes Melitus tipe 2

2. Manfaat di Bidang Penelitian

Data dari hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan dan pembandingan untuk penelitian lebih lanjut di bidang imunologi dan medis.

3. Manfaat di Bidang Pelayanan Medik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dan pertimbangan dalam proses penanganan dan terapi pasien diabetes pada umumnya dan diabetes tipe 2 khususnya, untuk meningkatkan kualitas hidup pasien.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

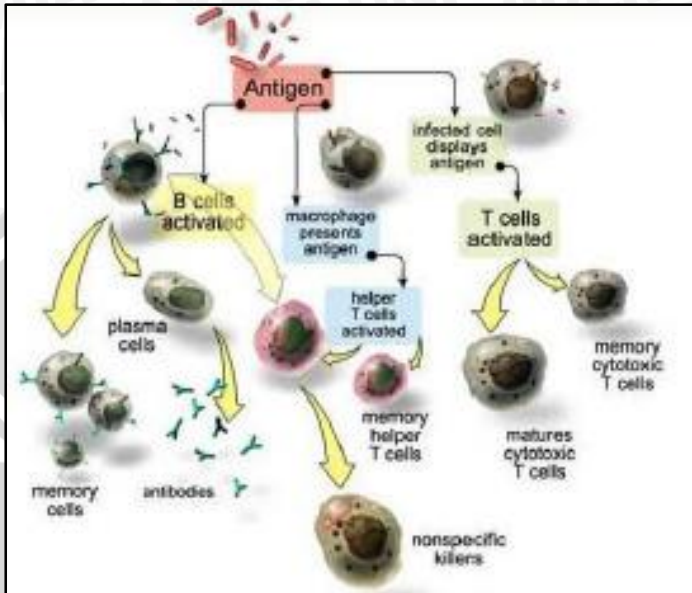
2.1 Sistem Imun

Imunologi adalah ilmu yang mempelajari struktur dan fungsi imunitas. Imunitas atau kekebalan adalah sistem mekanisme pada organisme yang melindungi tubuh terhadap pengaruh biologis luar dengan mengidentifikasi dan membunuh patogen serta sel tumor. Sistem ini mendeteksi berbagai macam pengaruh biologis luar yang luas, organisme akan melindungi tubuh dari infeksi, bakteri, virus sampai cacing parasit, serta menghancurkan zat-zat asing lain dan memusnahkan mereka dari sel organisme yang sehat dan jaringan agar tetap dapat berfungsi seperti biasa (Kresno, 2003).

Sistem imunitas merupakan sistem pertahanan tubuh yang tersusun secara kompleks. Sistem imun disusun oleh pertahanan yang kuat untuk melindungi tubuh dari invasi patogen. Sistem imun mempunyai beberapa fungsi, diantaranya (Harti, 2013) :

1. Melindungi tubuh dari invasi penyebab penyakit.
2. Menghancurkan dan menghilangkan mikroorganisme atau substansi asing (bakteri, parasit, jamur, dan virus serta tumor) yang (kedalam tubuh).
3. Menghilangkan jaringan atau sel yang mati atau rusak (debris sel) untuk perbaikan jaringan.
4. Mengenali dan menghilangkan sel yang abnormal.

Menurut Harti (2013) Sistem imun non-spesifik adalah sistem imun yang melawan penyakit dengan cara yang sama terhadap semua jenis penyakit. Sistem imun non-spesifik memiliki empat jenis pertahanan, diantaranya pertahanan fisik / mekanis, pertahanan biokimia, pertahanan humoral, dan pertahanan selular. Pertahanan fisik dapat berupa kulit, lapisan mukosa / lendir, silia atau rambut pada saluran nafas, mekanisme batuk dan bersin. Pertahanan biokimia ini adalah pertahanan yang berupa zat-zat kimia yang akan menangani mikroba yang lolos dari pertahanan fisik. Pertahanan humoral melibatkan molekul-molekul yang larut untuk melawan antigen. Biasanya molekul yang bekerja adalah molekul yang berada di sekitar daerah yang dilalui oleh mikroba. Pertahanan selular melibatkan sel-sel imun dalam melawan mikroba. Neutrofil, basofil, eosinofil, monosit, dan sel NK adalah sel sistem imun non-spesifik yang biasa ditemukan pada sirkulasi darah. Sedangkan sel yang biasa ditemukan pada jaringan adalah sel mast, makrofag dan sel NK.



Gambar 2.1 Respon Sistem imun (Paul, 2008).

Sistem imun spesifik adalah sistem imun yang membutuhkan pengenalan dahulu jenis antigen yang akan ditangani sehingga membutuhkan waktu yang agak lama untuk menimbulkan respon. Namun, perlindungan yang diberikan dapat bertahan lama karena sistem imun ini mempunyai memori terhadap paparan yang didapat. Sistem imun ini dibagi menjadi dua, yaitu sistem imun spesifik humoral dan sistem imun spesifik selular. Yang paling berperan pada sistem imun spesifik humoral ada sel B atau limfosit B (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

2.2 Spleen

Spleen (limfa) merupakan organ limfoid sekunder. Spleen terdiri dari bagian yang disebut pulpa merah. Pada tempat ini terjadi penghancuran sel darah merah yang sudah tua. Pulpa merah adalah tempat utama filtrasi spleen. Pulpa merah berselang-seling dengan pulpa putih. Pulpa putih atau spleenik white pulp adalah jaringan limfoid primer dan lokasi utama aksi imun dan fagositik. Disini, spleen memproses antigen awal dan menghasilkan imunoglobulin spesifik. Pada setiap pulpa putih, darah yang membawa limfosit dan antigen mengalir dari arteri trabekula masuk ke arteri sentral. Sel dan antigen

kemudian masuk ke dalam sinus dan berlanjut menuju vena trabekula. Sinus marginal dikelilingi oleh zona marginal limfosit. Di dalam sinus marginal dan di sekeliling arteri sentral terdapat periarteriolar lymphoid sheath (PALS) yang tersusun oleh sel T. Sintesis antibodi pada pulpa putih dan memindahkan dari darah dan sirkulasi lymph node, antibodi menyelimuti bakteri sama seperti antibodi menyelimuti sel darah merah. Meskipun susunan spleen dan lymph node mempunyai persamaan, namun antigen yang masuk ke spleen lebih banyak berasal dari darah daripada dari cairan ekstraselluler (lymph) (Brender *et al*, 2008).

2.3 Sel Limfosit T

Limfosit merupakan sel yang mampu mengenal dan menghancurkan berbagai determinan antigenik yang mempunyai dua sifat pada respon imun khusus, yaitu spesifitas dan memori. Sel T merupakan tipe limfosit yang berperan dalam proses infeksi dan perlawanan dalam darah. Secara umum, sel T terdiri dari (Roitt, 2003) :

1. *Helper T-cell* (Sel T penolong) yang membantu fungsi dari sel B. Tipe sel imun ini menstimulasi sel T pembunuh, makrofag, dan sel B untuk membuat respons imun. Dinamakan pula sebagai CD4⁺ limfosit T.
2. *Suppressor T-cell* (Sel T penekan) yang peranannya terbagi menjadi 2, yaitu menghambat sel B dan menghambat sel T.
3. *Cytotoxic T-Cell* (Sel T sitotoksik) yang merupakan imunisasi pasif didapat dimana sel menyerang antigen secara langsung.

Peranan dari limfosit T yaitu sebagai proliferasi dan diferensiasi yang terjadi di kelenjar timus. Sel T berfungsi dalam pertahanan terhadap bakteri (intraselular), virus, jamur, parasit, sel – sel ganas dan lain – lain. Limfosit T berbeda dengan limfosit B dalam hal respon terhadap antigen, akan menghasilkan antibodi spesifik. Limfosit T, dalam aktivitasnya harus melihat antigen di permukaan makrofag atau *Antigen Presenting Cell* (APC) bersama-sama dengan produk MHC. Ketika ada antigen masuk ke dalam tubuh, makrofag akan memfagosit antigen tersebut dan dengan bantuan enzim yang terdapat di dalam sitoplasmanya antigen akan didegradasi menjadi molekul yang lebih kecil. molekul antigen kemudian bergabung dengan MHC Class II dan ditransfer ke permukaannya sehingga akan dikenali oleh reseptor sel Th CD4 (Roitt, 2003)

2.4 Albumin Ikan Gabus

2.4.1 Definisi

Albumin adalah protein yang dapat larut air serta dapat terkoagulasi oleh panas dimana terdapat dalam serum darah dan bagian putih telur (Poedjaji, 1994). Dalam plasma manusia, albumin merupakan protein terbanyak (4,5 g/dl) yaitu sekitar 60% dari total plasma (Murray et al., 1993). Ikan gabus merupakan ikan karnivora yang suka memakan hewan lain yang lebih kecil, seperti cacing, udang, ketam, plankton dan udang renik (Hidayati, 1999)

2.4.2 Kandungan Albumin ikan gabus

Protein ikan gabus segar mencapai 25,1%, sedangkan 6,224 % dari protein tersebut berupa albumin. Jumlah ini sangat tinggi dibanding sumber protein hewani lainnya. Albumin merupakan jenis protein terbanyak di dalam plasma yang mencapai kadar 60 persen dan bersinergi dengan mineral Zn yang sangat dibutuhkan untuk perkembangan sel maupun pembentukan jaringan sel baru seperti akibat luka dan penyembuhan luka akibat operasi. Selain itu, kadar lemak ikan gabus relatif rendah dibandingkan kadar lemak jenis-jenis ikan lain (Suprayitno, 2006).

2.4.3 VipAlbumin

VipAlbumin merupakan kapsul hasil ekstrak ikan tawar sebagai sumber protein albumin bagi masyarakat. Kapsul albumin ini adalah salah satu alternatif sumber protein albumin dalam mengatasi masalah gizi kurang di Indonesia dengan harga relative terjangkau oleh masyarakat. Kapsul ini mengandung albumin, asam amino, serta mineral yang berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik koloid kapiler dan meningkatkan kekebalan tubuh secara alamiah.



Gambar 2.2. Ekstrak Albumin Ikan Gabus yang dikeas dalam produk VipAlbumin

VipAlbumin merupakan kapsul hasil ekstrak ikan tawar sebagai sumber protein albumin bagi masyarakat. Kapsul albumin ini adalah salah satu alternatif sumber protein albumin dalam mengatasi masalah gizi kurang di Indonesia dengan harga relative terjangkau oleh masyarakat. Kapsul ini mengandung albumin, asam amino, serta mineral yang berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik koloid kapiler dan meningkatkan kekebalan tubuh secara alamiah.

2.5 Glukosa Darah

Glukosa merupakan suatu monosakarida aldoheksosa yang dalam bentuk D- pada buah dan tanaman lain serta dalam darah hewan normal, glukosa juga dalam bentuk terikat dengan glukosida dan di-, oligo-, dan polisakarida; merupakan produk akhir metabolisme karbohidrat dan energi utama makhluk hidup yang dikontrol insulin (Dorland, 2002).

Kadar glukosa serum puasa dalam keadaan normal adalah 70-110 mg/dl. Didefinisikan sebagai hiperglikemia jika kadar glukosa serum puasa lebih tinggi dari 110 mg/dl, sedangkan hipoglikemia jika kadarnya kurang dari 70 mg/dl. Diagnosis DM dapat ditegakkan apabila kadar glukosa darah sewaktu plasma vena atau darah kapiler ≥ 200

mg/dl, kadar glukosa darah puasa plasma vena ≥ 126 mg/dl atau kadar glukosa darah puasa darah kapiler ≥ 110 mg/dl.

2.6 Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes Mellitus tipe 2 merupakan penyakit metabolisme serius dan memiliki tingkat prevalensi yang tinggi. Sembilan puluh persen kasus DM yang ditemui di masyarakat adalah Diabetes Mellitus tipe 2 (Syamsudin dkk., 2008). Diabetes Mellitus tipe 2 disebabkan karena resisten insulin hal ini terjadi akibat perubahan reseptor insulin pada membran sel berkurang dan strukturnya berubah sehingga tidak tanggap terhadap insulin. Kondisi ini menyebabkan glukosa yang masuk ke dalam sel berkurang. Diabetes melitus tipe 2 dikenal sebagai NIDDM (*Non-Insulin Dependent Diabetes Melitus*), artinya penderita DM tipe 2 tidak mutlak membutuhkan suntikan insulin setiap hari untuk mengatur metabolisme gula dalam darah. Diabetes tipe 2 merupakan akibat lemahnya kemampuan pankreas mensekresikan insulin, selain itu juga lemahnya aksi insulin, menjadi penyebab menurunnya sensitivitas insulin (Scobie, 2007).

Penurunan sensitivitas insulin terjadi pada pintu masuk di permukaan sel tubuh yang dinamakan reseptor insulin. Penyebab terjadinya penurunan sensitivitas insulin adalah karena peningkatan kebutuhan sekresi insulin untuk mempertahankan kadar glukosa darah. Reseptor insulin akan memberikan signal pada transporter glukosa untuk memungkinkan lewatnya glukosa yang dibawa oleh hormon insulin masuk ke dalam sel (Syamsudin dkk., 2008). Di dalam mitokondria, gula kemudian akan digunakan untuk menghasilkan energi yang diperlukan untuk melangsungkan fungsi setiap sel tubuh. Patofisiologi DM tipe 2 disebabkan oleh resistensi insulin perifer, rendahnya produksi glukosa hepatic dan menurunnya fungsi sel beta yang mengakibatkan kegagalan fungsi sel beta. Prevalensi awal DM tipe 2 diawali oleh defisit sekresi insulin dan pada sebagian besar penderita, defisiensi insulin berhubungan dengan resistensi insulin perifer (Stumvoll *et al.*, 2005).

Penderita DM tipe 2 mempunyai sirkulasi endogen cukup untuk mencegah terjadinya ketoasidosis tetapi insulin tersebut sering dalam kadar yang kurang normal atau kadarnya relatif tidak mencukupi karena kurang pekanya jaringan untuk memproduksi insulin. Selain terjadi penurunan kepekaan jaringan pada insulin, terjadi pula defisiensi respon sel beta pankreas terhadap glukosa (Katzung, 2002). Patogenesis dari DM tipe 2 sangat kompleks termasuk interaksi dari faktor genetik dan

lingkungan. Latar belakang etnis, jenis kelamin, dan usia merupakan faktor penting dalam menentukan perkembangan risiko diabetes tipe ini (Buse *et al.*, 2003). Diabetes tipe 2 biasanya timbul pada usia lebih dari 40 tahun. Kebanyakan pasien diabetes tipe ini bertubuh gemuk, dan resistensi terhadap kerja insulin dapat ditemukan pada banyak kasus (Woodley dan Whelant, 1995).

2.7 .Insulin

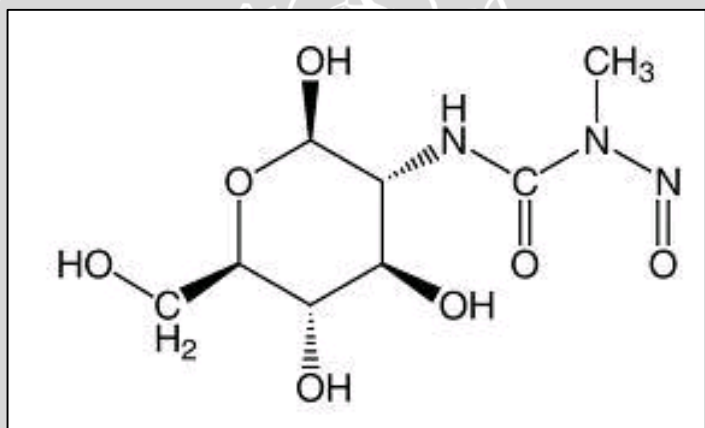
Insulin merupakan salah satu hormon dalam tubuh manusia yang dihasilkan oleh sel β yang terdapat dalam kelenjar pankreas. Hormon ini menurunkan kadar glukosa, asam lemak, dan asam amino dalam darah. Insulin terdiri atas dua rantai asam amino yang dihubungkan oleh ikatan disulfi dedisintesis sebagai protein perkursor (pro insulin) yang mengalami pemisahan proteolitik untuk membentuk insulin dan peptide c, keduanya di sekresikan oleh sel β pankreas (Mycek, 2001). Insulin berpengaruh dalam tubuh dan mempengaruhi proses biokimiawi. Pengaruh menyeluruh dari hormon ini adalah memudahkan pemakaian glukosa oleh sel dan mencegah pemecahan glikogen berlebih yang disimpan di dalam hati dan otot (Turner, 2000).

Sekresi insulin tidak hanya diatur oleh kadar glukosa darah tetapi juga oleh hormon lain dan mediator autonomik. Sekresi insulin dipacu oleh glukosa darah yang tinggi dan difosforilasi dalam sel β pankreas (Mycek, 2001). Faktor yang berperan dalam pengaturan sekresi insulin adalah bermacam macam nutrient, hormon saluran cerna, hormon pankreas dan neurotransmitter otonom, glukosa, asam amino, asam lemak, dan benda keton. Stimulasi reseptor α_2 adrenergik menghambat sekresi insulin, sedang β_2 adrenergik agonis dan stimulasi saraf vagal akan merangsang sekresi insulin (Mycek, 2001).

2.8 Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin (STZ) secara luas digunakan untuk menginduksi hewan eksperimental diabetik. STZ merupakan bahan toksik yang dapat merusak sel β pankreas secara langsung. Pemberian dosis streptozotocin yang tepat dapat memulai proses kerusakan sel β pankreas dan efek toksik DM. Streptozotocin mempunyai efek diabetagenik yang paten. Ada beberapa mekanisme diabetagonik dari STZ diantaranya adalah STZ menyebabkan kerusakan DNA pada islet pankreas dan menstimulasi poly adenosin diphosphate (ADP) ribosylation. Mekanisme tersebut ditunjukkan dengan pemberian STZ dapat meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS), yang menyebabkan kenaikan

fragmentasi DNA dan memicu perubahan dalam sel. STZ terakumulasi pada sel β pankreas melalui low-affinity GLUT2 glucose transporter pada membran plasma. Sel β pankreas mempunyai memiliki jumlah GLUT 2 lebih banyak daripada sel tubuh lain, sehingga STZ memiliki toksisitas selektif terhadap sel β pancreas. Masuknya gugus metil (alkilasi) dari streptozotocin ke dalam molekul DNA akan menyebabkan kerusakan pada fragmen DNA. Kerusakan DNA tersebut nantinya akan mengaktifkan poly adenosine diphosphate (ADP)-ribosylation. Proses ini akan mengakibatkan penghabisan nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) seluler, lebih lanjut akan terjadi pengurangan adenosine triphosphate (ATP). Selain itu STZ menginduksi terbentuknya radikal-radikal bebas, misalnya superoksida (O₂⁻), hidrogen peroksida (H₂O₂), hidroksil (OH⁻), dan lain-lain (Szkudelski, 2001).



Gambar 2.3 Struktur kimia *Streptozotocin* (Lenzen, 2008).

Streptozotocin (STZ) memiliki rumus kimia (2-deoxy-2(3-(methyl-3 nitrosoureido)-D-glucopyranose)) disintesis oleh *Streptomyces acrhomogenes* (Szkudelski, 2001) dan sering digunakan sebagai induksi *insulin-dependent* dan *non-insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM dan NIDDM) pada hewan uji karena selektif merusak sel β pankreas (Pathak *et al.*, 2008). STZ bekerja langsung pada sel β pankreas, dengan aksi sitotoksiknya dimediasi oleh *reactive oxygen species* (ROS) sehingga dapat digunakan sebagai induksi DM. STZ masuk ke sel β pankreas melalui *glucose transporter* (GLUT2) dan akan menyebabkan alkilasi DNA. Alkilasi atau masuknya gugus metil dari STZ ke dalam molekul DNA ini akan menyebabkan kerusakan

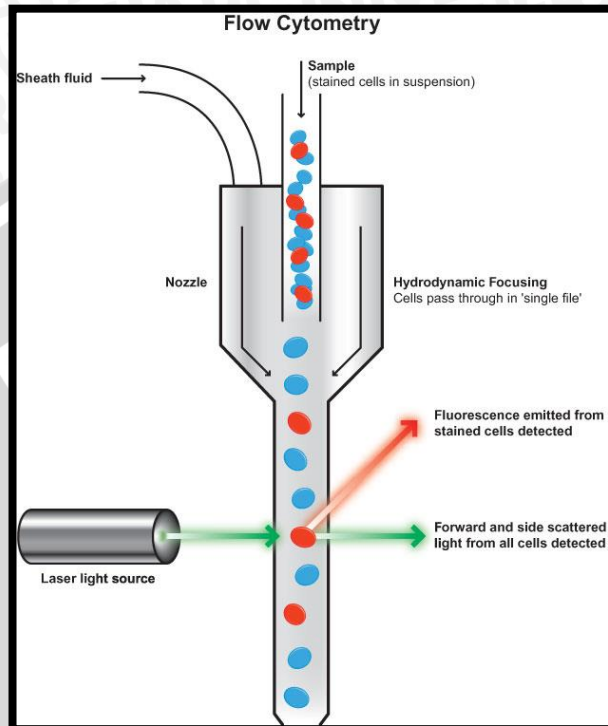
fragmentasi DNA (Elsner *et al.*, 2000). *Protein glycosylation* diduga sebagai faktor kerusakan yang utama.

2.9 Flowcytometry

Flowcytometry adalah suatu teknik yang digunakan untuk menganalisis berbagai komponen seluler (asam nukleat, lemak, protein), organel (lisosom, mitokondria) dan fungsi (viabilitas, aktivitas enzimatis). Secara normal *flow cytometri* digunakan untuk perhitungan populasi sel limfosit. Hal tersebut dapat digunakan untuk menjelaskan secara spesifik presentase limfosit yang mengandung immunoglobulin atau *cluster of differentiation* (CD) atau produksi protein tertentu seperti sitokin yang menggunakan intracellular cytokine staining (ICCS) (Abcam, 2013).

Prinsip kerja dari *flow cytometri* (Gambar 3) adalah menyebarkan cahaya, eksitasi cahaya dan pemancaran molekul fluokrom untuk menghasilkan multiparameter data yang spesifik dari partikel dan sel yang memiliki rentan ukuran diameter 0,5-40 μm . Sel dilabel fluoresen, dilewatkan celah sempit, dan ditembak sinar (Rahman, 2006). *Flow Cytometry* digunakan untuk memeriksa sifat fisik dan kimia sel. Flow cytometri dapat digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik permukaan setiap sel dengan kemampuan memisahkan sel-sel yang berada dalam suatu suspensi menurut karakteristik masing-masing secara otomatis melalui suatu celah yang ditembus oleh seberkas sinar laser. Antibodi yang telah diberi label sering digunakan untuk memantau kehadiran protein atau molekul target lain di permukaan sel (Randox, 2014).

Aplikasi utama pada *flow cytometri* ialah memisahkan sel berdasarkan sub tipe atau ekspresi epitope berdasarkan sifat berdasarkan sifat biologi yang dimiliki oleh sel. Proses tersebut disebut dengan analisis FACSTM. Prinsip penting pada *flow cytometri* adalah visualisasi sel yang diinginkan secara selektif ketika hasil eliminasi dari partikel yang tidak diinginkan akan menjadi debris sel dan sel mati (Rahman, 2006).



Gambar 2.4. Prinsip kerja *flow cytometer* (Abcam, 2014).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus - Desember 2014 dan bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengentahuan Alam dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah neonatal mencit (*Mus musculus*) *pathogen free* strain Balb/C yang berusia 5 hari. Albumin yang digunakan dalam bentuk serbuk dari ekstrak albumin yang dikemas dalam produk “Vipalbumin”. Parameter yang diamati adalah perkembangan sel Limfosit T yang meliputi sel $CD4^+$, $CD8^+$, SDF-1⁺, sel T naive $CD4^+CD62L^+$ dan $CD8^+CD62L^+$. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, eppendorf, tabung propilen, sonde, neraca, papan bedah, gunting bedah, pinset bedah, sentrifuse, pangkal spuit, cawan petri, *wire*, *beaker glass*, inkubator, autoklaf, oven, mikroskop, *haemocytometer*, *cover glass*, *cuvet flow cytometer*, *flow cytometer*, *ice box*. Bahan-bahan yang digunakan adalah aquades, ekstrak albumin ikan gabus yang dikemas dalam bentuk VipAlbumin[®], PBS, kapas, alkohol 70%, dietil ether, evans blue, balok es, *rat anti-mouse anti-CD4 FITC conjugated*, *rat anti-mouse anti-CD8 PE conjugated*, *rat anti-mouse anti-CD62L PE conjugated* dan *PE/cy5 conjugated rat anti-mouse SDF-1*.

3.3 Kegiatan Penelitian

3.3.1 Persiapan dan Aklimatisasi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Balb/c. 6 ekor induk betina dikawinkan dengan 2 ekor induk jantan. Kemudian 25 ekor anak mencit yang diperoleh, diberi tanda untuk digunakan pada proses penelitian berikutnya. Hewan coba dimasukkan ke dalam beberapa kandang berlabel berisi serutan kayu dan berpenutup ram-raman kawat. Selain itu, mencit diberi makanan berupa pelet berbentuk biskuit dan air mineral dalam jumlah cukup.

3.3.2 Injeksi STZ untuk model Diabetes Mlitus tipe 2

Sejumlah anak mencit, dibagi menjadi lima kelompok dosis. Satu kelompok kontrol negatif (tanpa DM 2), satu kelompok kontrol positif (dengan DM 2), dan tiga kelompok perlakuan berbeda dosis. Pada kelompok dosis dan kontrol positif, mencit diinjeksi dengan *Streptozotocin* pada umur 5 hari dengan dosis 100 mg/kg BB dan volume injeksi 50 µl secara intraperitoneal.

3.3.3 Pembuatan larutan albumin untuk disondekan

Ekstrak albumin yang telah terkemas di dalam kapsul dibuka dan ditimbang sesuai dosis. Ekstrak albumin tersebut kemudian dilarutkan dalam aquades untuk mempermudah dalam melakukan sonde terhadap mencit.

3.3.4 Pemeriksaan Kadar Gula Darah

Pemeriksaan kadar gula darah dilakukan tiga hari sekali. Mencit setelah diinjeksi STZ diambil darah melalui ekor untuk ditentukan kadar glukosa darah. Pengukuran dilakukan menggunakan glucometer. Sampel darah ditetaskan pada strip glucometer secukupnya hingga angka otomatis pada alat mulai berjalan. Pemeriksaan kadar gula darah dengan glucometer juga dilakukan setelah diberi perlakuan ekstrak albumin yang dikemas dalam kapsul VipAlbumin dengan berbagai dosis.

3.3.5 Pemberian Perlakuan VipAlbumin

Mencit ditimbang dan dihitung rata-rata berat badannya (BB). VipAlbumin hasil ekstraksi ekstrak albumin ikan gabus ditimbang berdasarkan dosis dan berat badan mencit, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga diperoleh volume sediaan yang diinginkan. Kelompok perlakuan diberi volume sediaan sesuai dengan dosis yang ditentukan. Pemberian sediaan ekstrak albumin secara oral dilakukan selama 15 hari. Kelompok kontrol positif dan negatif tidak diberi perlakuan ekstrak albumin.

3.3.6 Pembedahan Hewan Coba

Seluruh mencit yang digunakan dalam penelitian didislokasi pada bagian leher dan dibedah untuk diisolasi organ spleen yang sebagian besar pada organ tersebut banyak terdapat sel Limfosit T.

3.3.7 Isolasi Sel

Organ spleen yang diperoleh dicuci dalam larutan PBS dan dipencet dalam larutan PBS terpisah hingga seluruh sel menjadi larut dalam PBS. Suspensi pelet disaring dan dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml dengan volume mencapai 10 ml. Suspensi tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, 10°C, selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifus dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 ml PBS lalu dihomogenasi.

3.3.8 Persiapan Uji *Flow cytometry*

Persiapan uji *flow cytometry* untuk hasil penelitian secara *in vivo* yaitu suspensi pelet dari masing-masing sampel sebanyak 50 μ l dimasukkan kedalam *microtube* yang berisi 500 μ l PBS. Suspensi sel kemudian dihomogenasi dan disentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet ditambah dengan 500 μ l PBS dan diambil masing-masing 50 μ l kedalam tabung eppendorf. Untuk pewarnaan intraseluler (SDF-1) 50 μ l *homogenate* sel hepar dimasukan dalam tabung eppendorf dan ditambahkan 20 μ l *cytofix-cytoferm* kemudian dipipeting dan diinkubasi selama 20 menit [ada suhu 4°C. Lalu ditambah *washperm* sebanyak 500 μ l. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dan dilanjutkan dengan prosedur pewarnaan dengan antibodi *PE/cy5 conjugated rat anti-mouse SDF-1*.

Untuk pewarnaan ekstraseluler, 50 μ l homogenat ditambahkan antibodi monoklonal yaitu *rat anti-mouse anti-CD4 FITC conjugated*, *rat anti-mouse anti-CD8 PE conjugated*, dan *rat anti-mouse anti-CD62L PE conjugated* lalu disimpan dalam *ice box* selama 20 menit. Kemudian dimasukkan kedalam kuvet dan ditambah 300 μ l PBS dan dilakukan *running flow cytometri*.

3.3.9 Analisa Data

Data hasil *flow cytometry* dianalisa dengan menggunakan *softwer* BD cellquest ProTM. Program diatur sesuai dengan pewarnaan antibodi dan jenis sel yang diidentifikasi. Gated dilakukan berdasarkan pola ekspresi sel yang terlihat. Data hasil analisa *softwer* BD cellquest ProTM ditabulasi dan dianalisis menggunakan ANOVA dengan selang kepercayaan 95 %. Data yang digunakan berupa perubahan kuantitas jumlah sel T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD62L⁺, CD8⁺CD62L⁺, dan SDF-1⁺ yang diuji statistik dengan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Data yang berdistribusi normal di uji menggunakan *one-way* ANOVA dengan nilai $\alpha=0,05$. Apabila diperoleh hasil $p>0,05$ maka tida terdapat

perbedaan nyata antar masing-masing perlakuan, sebaliknya jika $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan nyata antar masing-masing perlakuan yang di bandingkan. Selanjutnya dilakukan *post-hoc test* dengan uji Tukey HSD (*High Significant Difference*). Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 for Windows.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

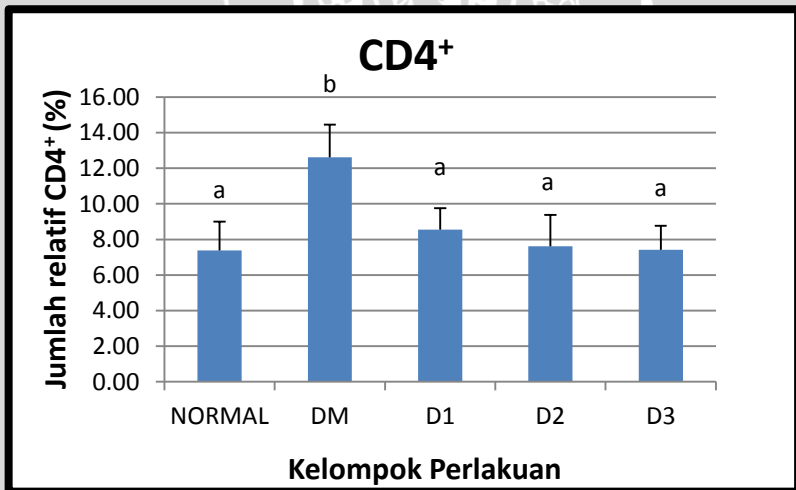


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Jumlah Total Sel T CD4⁺

Berdasarkan hasil analisa *flow cytometry* pada organ *lymp node* (Gambar 4.1) setelah dilakukan injeksi STZ secara intraperitoneal pada bayi mencit umur 5 hari menunjukkan bahwa jumlah sel T CD4⁺ pada perlakuan Diabetes Melitus (DM) meningkat signifikan sebesar 12,61 % dibandingkan dengan mencit sehat sebesar 7,37 %. Peningkatan jumlah sel T CD4⁺ pada mencit DM di akibatkan oleh pemberian STZ yang dapat memicu proliferasi sel T CD4⁺. Injeksi STZ menyebabkan teraktivasinya makrofag yang meningkatkan killing sel (NK) yang memproduksi sitokin. Sitokin yang disekresikan antara lain TNF α yang dibutuhkan untuk produksi INF γ , dimana INF γ mampu meningkatkan CMI dan menginduksi proliferasi sel T CD4. Setelah pemberian VipAlbumin[®] terjadi penurunan jumlah sel T CD4⁺ (Sujudi. 2006).



Gambar 4.1 Jumlah relatif sel T CD4⁺ pada *spleen* setelah injeksi per oral 0,25 ml VipAlbumin[®] dalam akuades selama 15 hari (Normal = Mencit sehat, DM = Mencit Diabetes Injeksi STZ, D1= dosis 0,01664 mg/g BB, D2= dosis 0,0416 mg/g BB, D3= dosis 10,4 mg/g BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda pada perlakuan pemberian VipAlbumin[®] menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey HSD.

Pasca injeksi STZ menunjukkan bahwa pemberian VipAlbumin[®] D1 dan D2 dapat menurunkan jumlah sel T CD4⁺ pada mencit DM secara signifikan ($p < 0,05$) (Gambar 4.3). Pemberian VipAlbumin[®] dosis D1 dan D2 mampu menurunkan jumlah sel T CD4⁺ yang teraktivasi masing-masing sebesar 8,54 % dan 7,62 % namun kedua perlakuan tersebut tidak berbeda nyata. Pemberian VipAlbumin[®] dosis D3 mg/g BB menurunkan jumlah sel T CD4⁺ sebesar 7,41 % melebihi jumlah normal yaitu 7,37 %.

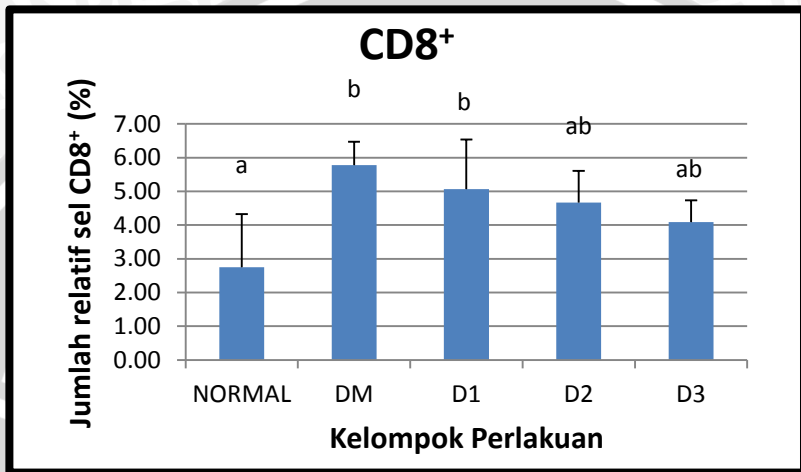
Jumlah relatif sel T CD4⁺ yang menurun pada perlakuan yang diberi perlakuan VipAlbumin[®] menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki efek immunosupresan terhadap sel T CD4⁺. Efek tersebut dapat diperoleh dari zat-zat aktif yang terkandung dalam ekstrak VipAlbumin[®]. Interaksi sel Th hasil dari aktivasi CD4⁺ dengan APC akan berperan dalam kekebalan humoral dengan menginduksi keluarnya sitokin yang merupakan alat komunikasi antar sel. Kemampuan interaksi ini akan menginduksi pematangan sel limfosit B menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi. Cara kerja immunosupresan berkebalikan dengan immunostimulan. Immunosupresan cenderung menghambat proses transkripsi dari sitokin sehingga sitokin-sitokin yang berperan dalam aktivasi sel semakin sedikit kadarnya. Immunosupresan menyebabkan penurunan jumlah IL-2 dan IFN γ sehingga dalam kondisi tersebut jumlah sel yang teraktivasi akan semakin menurun (Rifa'i, M. 2010).

4.2 Analisis Jumlah Total Sel T CD8⁺

Berdasarkan hasil analisa *flow cytometry* pada organ *lymp node* (Gambar 4.2) setelah injeksi STZ secara intraperitoneal pada bayi mencit umur 5 hari menunjukkan bahwa jumlah sel T CD8⁺ pada perlakuan DM meningkat secara signifikan sebesar 5,77 % dibandingkan dengan mencit sehat sebesar 2,75 %. Peningkatan jumlah sel T CD8⁺ pada mencit DM diakibatkan oleh pemberian STZ yang dapat memicu proliferasi sel T CD8⁺.

Pasca injeksi STZ menunjukkan bahwa pemberian VipAlbumin[®] D1 dan D2 dapat menurunkan jumlah sel T CD8⁺ pada mencit DM secara signifikan ($p < 0,05$) (Gambar 4.4). Pemberian VipAlbumin[®] D1 dan D2 mampu menurunkan jumlah sel T CD8⁺ yang

teraktivasi masing-masing sebesar 5,07 % dan 4,67 % namun kedua perlakuan tersebut tidak berbeda nyata. Pemberian VipAlbumin® dosis 10,4 mg/g BB menurunkan jumlah sel T CD8⁺ sebesar 4,09 %.



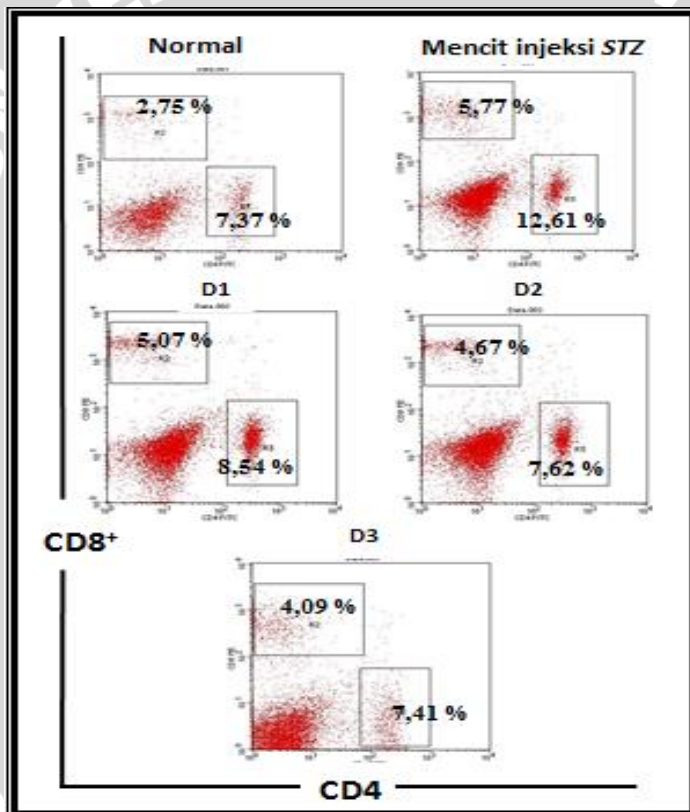
Gambar 4.2 Jumlah relatif sel T CD8⁺ pada *spleen* setelah injeksi per oral 0,25 ml VipAlbumin® dalam akuades selama selama 15 hari (Normal = Mencit sehat, DM = Mencit Diabetes Injeksi STZ, D1= dosis 0,01664 mg/g BB, D2= dosis 0,0416 mg/g BB, D3= dosis 10,4 mg/g BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda pada perlakuan pemberian VipAlbumin® menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey HSD.

Jumlah sel T CD4⁺ menurun menyebabkan jumlah sel T CD8⁺ juga akan menurun karena sel CD4⁺ yang teraktivasi akan berkembang menjadi sel Th1 dan Th2. Sel Th1 mampu mensintesis sitokin IL2 untuk meningkatkan proliferasi dan aktivasi sel imunokompeten lain seperti sel T CD8⁺, sel NK, makrofag dll. Selain itu respon sel T CD8⁺ akan meningkat dengan fungsi yang lebih optimal apabila jumlah sitokin proinflamasi yang dilepas sel limfosit T CD4⁺ semakin banyak (Linda dkk., 2012).

Selain berfungsi mengaktifkan sel sel imunokompeten, sel Th1 yang telah aktif tersebut juga memproduksi sitokin seperti IFN γ yang berperan untuk meningkatkan ekspresi MHC I yang akan dikenali sel T CD8⁺ sehingga sel T CD8 naif dapat teraktivasi menjadi sel T efektor,

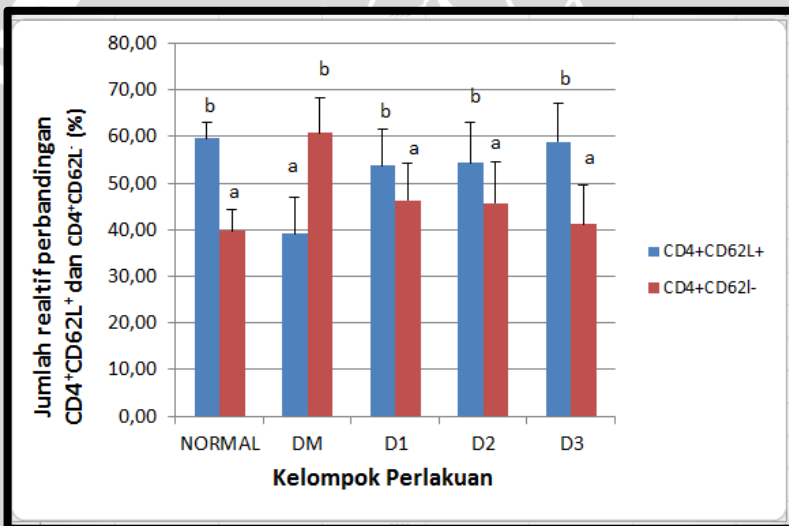
maka dari itu jumlah sel T CD4⁺ yang menurun akan menyebabkan sel T naif tidak mampu berdiferensiasi menjadi sel T CD8⁺ efektor secara optimal. Menurunnya jumlah sitokin IFN γ juga akan berdampak pada menurunnya aktivasi makrofag yang mampu mensekresi IFN α , hal ini akan menyebabkan penurunan ekspresi MHC I sebagai kompleks yang dikenali sel T CD8⁺ (Baratawijaya dan Iris, 2010). Sel T CD8⁺ dibutuhkan untuk mengontrol sitokin-sitokin proinflamasi dan membantu kerja CD4⁺ ketika respon sel CD4 tidak mampu mengatasi antigen yang masuk dalam tubuh sehingga proliferasi dan deferensiasi sel T sitotoksik tidak meningkat (Wahyuni, 2009).



Gambar 4.3 Presentase jumlah sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal STZ

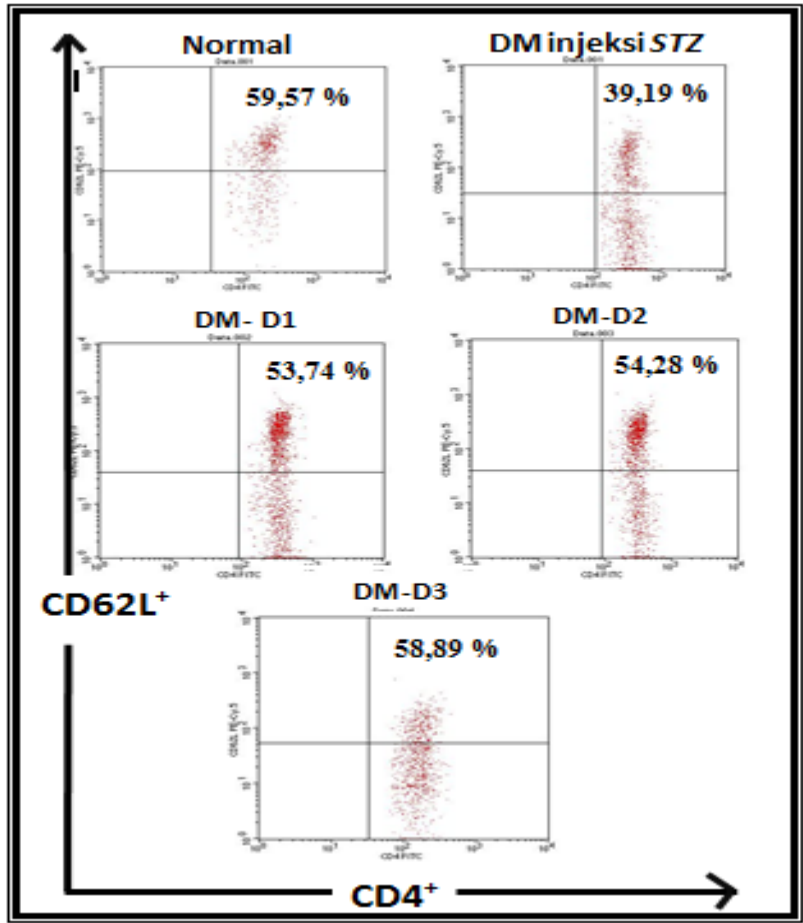
4.3 Analisis Jumlah Total Sel CD4⁺CD62L⁺

Berdasarkan hasil analisa *flow cytometry* sel T CD4⁺CD62L⁺ menunjukkan bahwa adanya peningkatan sel T CD4 naive pada mencit yang di injeksi STZ dan diberi VipAlbumin[®] D3 secara signifikan ($p>0,05$) yaitu 58,89 % yang mendekati jumlah normal sebesar 59,57 % di dibandingkan dengan mencit injeksi STZ yang hanya 39,19 % (Gambar 4.5). Peningkatan juga terjadi pada D1 dan D2 sebesar 53,74 % dan 54,28 %. Peningkatan sel T CD4 naive dari kontrol (+) ke perlakuan dosis berbeda nyata, namun peningkatan sel T CD4 naive pada perlakuan dosis tidak berbeda nyata. Pada hasil sel T CD4⁺CD62L⁻ terlihat bahwa terjadi penurunan yang signifikan pada perlakuan dosis dan berbeda nyata dengan peningkatan sel T CD4⁺CD62L⁺ yang cenderung lebih tinggi (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Jumlah relatif perbandingan sel T CD4⁺CD62L⁺ dan sel T CD4⁺CD62L⁻ pada *spleen* setelah injeksi per oral 0,25 ml VipAlbumin[®] dalam akuades selama selama 15 hari (Normal = Mencit sehat, DM = Mencit Diabetes Injeksi STZ, D1= dosis 0,01664 mg/g BB, D2= dosis 0,0416 mg/g BB, D3= dosis 10,4 mg/g BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda pada perlakuan pemberian VipAlbumin[®] menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey HSD.



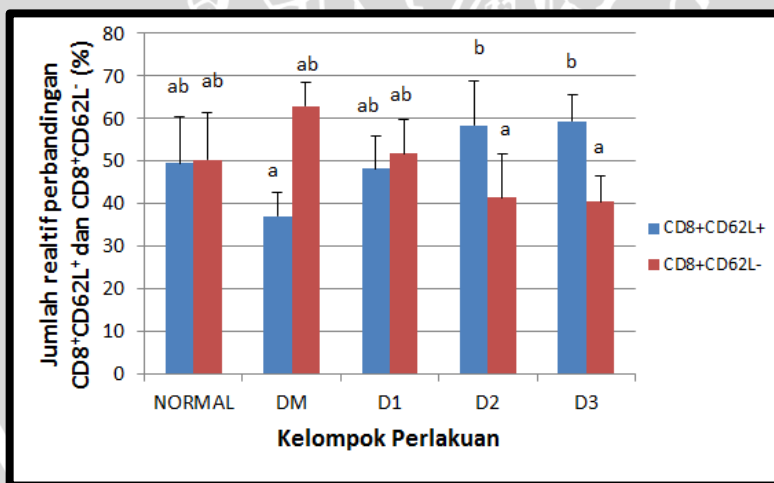
Gambar 4.5 Presentase jumlah sel T CD4⁺CD62L⁺ di spleen pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal STZ

CD62L⁺ atau disebut juga L selektin merupakan molekul adhesi yang memiliki fungsi perlekatan pada sel endotel pembuluh darah. Molekul adhesi tersebut mampu di ekspresikan oleh sel T naive CD4⁺CD62L⁺. Sel T naive tersebut akan mengalami sirkulasi di dalam darah, spleen dan *lymph node* hingga bertemu dengan antigen. Jika sudah bertemu dengan antigen maka sel T naive akan teraktivasi dan

kehilangan molekul CD62L⁺ yang mampu di ekspresikan oleh sel T naive dalam individu normal orang sehat lebih dari 80 %. Sedangkan pada individu yang tidak sehat sel T naive akan mengalami penurunan ekspresi CD62L⁺ pada organ *lymph node* periperal dan sel T akan teraktivasi. Selanjutnya molekul CD62L⁺ melakukan down regulated pada sel T yang nantinya akan menghalangi molekul CD62L⁺ masuk ke *lymph node* dalam sel endotel. Hal ini untuk mencegah *killing* terhadap APC sel dendritik karenan adanya aktivasi sel T CD8⁺ dan peningkatan sel T untuk melawan antigen yang masuk (Tedder, 1995).

4.4 Analisis Jumlah Total Sel CD8⁺CD62L⁺

Berdasarkan hasil analisa *flow cytometry* sel T CD8⁺CD62L⁺ menunjukkan bahwa adanya peningkatan sel T CD8 naive pada mencit yang di injeksi STZ dan diberi VipAlabumin[®] D1 dan D2 secara signifikan ($p>0,05$) masing-masing sebesar 58,77 % dan 59,45% di bandingkan dengan mencit DM yang hanya 37,06 %. Hal ini menunjukan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam VipAlabumin[®] mampu menekan jumlah sel T CD8⁺ sehingga meningkatkan jumlah sel T CD8 naive.

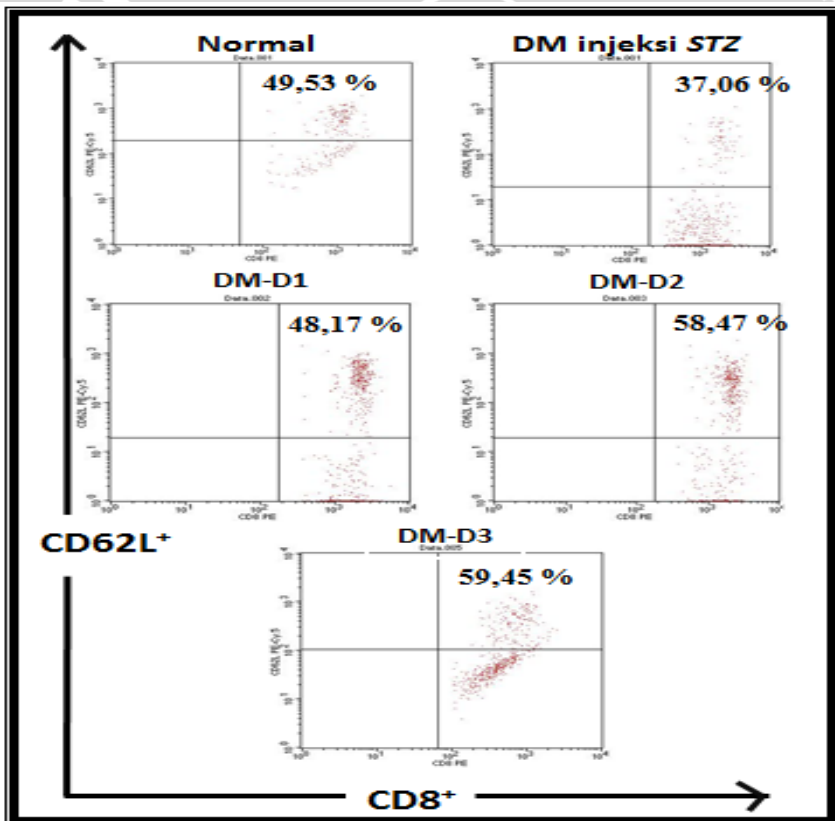


Gambar 4.6 Jumlah relatif perbandingan sel T CD8⁺CD62L⁺ dan sel T CD8⁺CD62L⁻ pada *spleen* setelah injeksi per oral 0,25 ml VipAlbumin[®] dalam akuades selama selama 15 hari (Normal = Mencit sehat, DM = Mencit Diabetes Injeksi STZ, D1=

dosis 0,01664 mg/g BB, D2= dosis 0,0416 mg/g BB, D3= dosis 10,4 mg/g BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda pada perlakuan pemberian VipAlabumin® menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey HSD.

Berdasarkan gambar 4.6 peningkatan sel T CD8 naive dari mencit DM ke perlakuan D2 dan D3 berbeda nyata, namun peningkatan sel T CD8 naive pada perlakuan dosis D1 tidak berbeda nyata. Pada hasil sel T CD8⁺CD62L⁻ terlihat bahwa terjadi penurunan yang signifikan pada perlakuan dosis dan berbeda nyata dengan peningkatan sel T CD8⁺CD62L⁺ yang cenderung lebih tinggi.

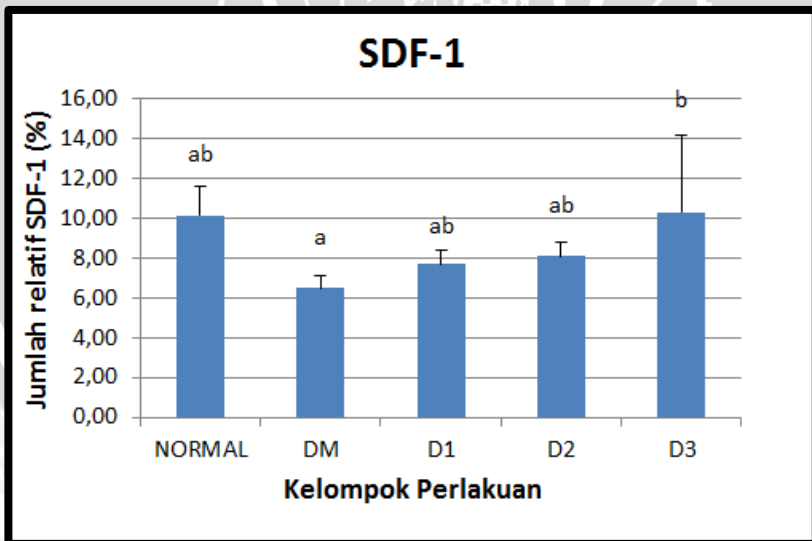


Gambar 4.7 Presentase jumlah sel T CD8⁺CD62L⁺ pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal STZ

Sel T naif CD62L merupakan sel yang belum pernah terpapar antigen dan kurang reaktif terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Ketika jumlah sel T teraktifasi menurun maka jumlah sel T naif lebih banyak begitu pula sebaliknya. Jumlah sel T CD62L akan berkurang seiring dengan meningkatnya jumlah sel T CD8⁺ yang teraktifasi. Menurut Jan dkk. (2007), CD62L merupakan marker aktivasi sel, sehingga penurunan jumlah sel T CD62L mengindikasikan aktivasi sel T naif menjadi sel T CD8⁺.

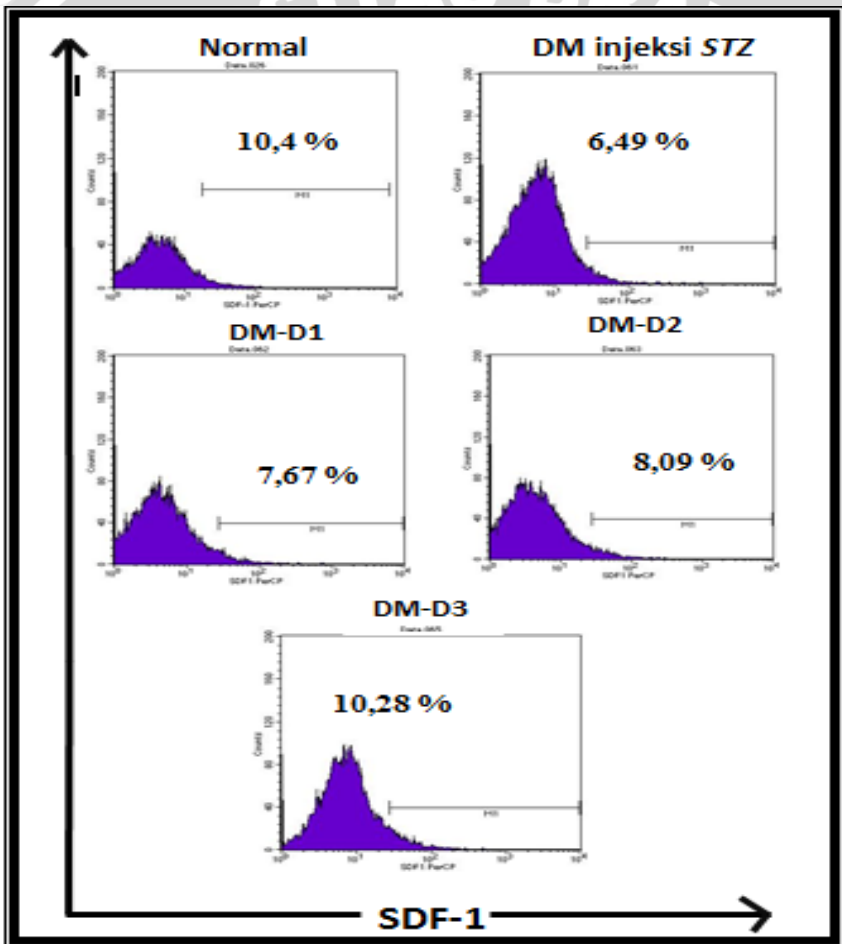
4.4 Analisis Jumlah Total SDF-1

Berdasarkan hasil analisa *flow cytometry* jumlah total SDF-1 menunjukkan bahwa adanya peningkatan SDF pada mencit yang telah di injeksi STZ dan diberi VipAlabumin[®] D1, D2 dan D3 secara signifikan ($p > 0,05$) yaitu masing-masing 7,67 % , 8,69 % dan 10,28 % di bandingkan dengan mencit DM yang hanya 6,49 %. Hal ini menunjukan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam VipAlabumin[®] mampu meningkatkan jumlah SDF-1 pada penderita DM.



Gambar 4.8 Jumlah relatif SDF-1 pada hepar setelah injeksi per oral 0,25 ml VipAlbumin® dalam akuades selama selama 15 hari (Normal = Mencit sehat, DM = Mencit Diabetes Injeksi STZ, D1= dosis 0,01664 mg/g BB, D2= dosis 0,0416 mg/g BB, D3= dosis 10,4 mg/g BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda pada perlakuan pemberian VipAlabumin® menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey HSD.



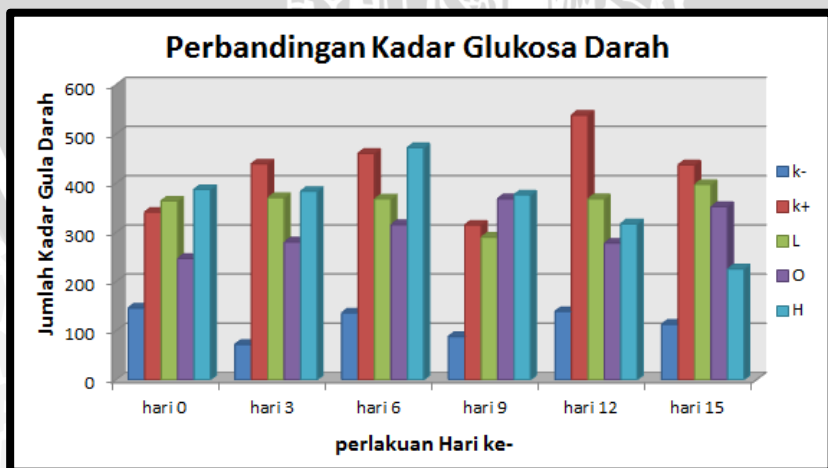
Gambar 4.9 Presentase jumlah total SDF-1 pada masing-masing perlakuan setelah injeksi intraperitoneal STZ

Menurut Otero L, *et al* (2012) SDF-1 merupakan kemo-atraktan utama untuk memulai migrasi sel punca. Molekul SDF-1 secara rutin dihasilkan sel endotel sumsum tulang, mengakibatkan sel punca tetap tinggal dalam sumsum tulang disebut *integrin-mediated arrest of stem cell*. Pada keadaan iskemia, SDF -1 dilepaskan oleh jaringan yang cedera sehingga kadar SDF-1 dilokasi tersebut meningkat. Peninggian produksi SDF-1 di area lesi akan merekrut sel punca ke daerah tersebut sehingga terbentuk habitat baru. Selanjutnya sel punca akan membelah menjadi sel dewasa

SDF-1 merupakan salah satu protein yang mengatur perjalanan lekosit ke lokasi lesi saat terjadi respons imun terhadap keadaan patologis. Selanjutnya protein tersebut akan berikatan dengan suatu reseptor yaitu reseptor *seven-transmembran G-protein coupled* yaitu CXCR4 dan CXCR7, namun hanya CXCR4 yang mengeluarkan sinyal, sehingga diduga sinyal CXCL2-CXCR4 merupakan faktor penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sistim saraf dan migrasi sel punca sehingga dapat disebut aksis SDF-1/CXCR4 merupakan pusat pengaturan migrasi sel punca (Kokovay E, *et al.* 2010).

4.5 Analisis Jumlah Total Penurunan Gula Darah

Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil pengukuran gula darah menggunakan glucometer menunjukkan bahwa rata-rata kadar gula darah setelah injeksi STZ dan diberi perlakuan selama 15 hari dengan VipAlbumin® mengalami penurunan yang tidak stabil dibandingkan dengan mencit yang normal atau sehat (Gambar 4.10).



Gambar 4.10 Jumlah rata-rata penurunan glukosa darah pada hari ke-0 hingga hari ke- 15 dari masing-masing kelompok perlakuan.

Kelompok mencit yang hanya di injeksi *STZ* ternyata juga mengalami penurunan kadar gula darah. Gula darah rata-rata yang diperoleh pada mencit normal rata-rata sebesar 115 mg/dl di bandingkan dengan yang di injeksi *STZ* sebesar 420 mg/dl. Kemudian terjadi penurunan pada perlakuan yang di beri VipAlbumin® rata-rata sebesar 225 mg/dl pada Dosis tinggi. Pada penelitian ini pemberian Vipalbumin® atau ekstrak ikan gabus tidak memberi perubahan penurunan gula darah yang berarti. Hal ini mungkin dikarenakan kandungan antioksidan pada ekstrak ikan gabus tidak dominan, sehingga kurang mampu menurunkan kadar gula darah, juga dapat dikarenakan stress yang timbul pada saat percobaan yang di alami mencit, sehingga kadar gula darah malah meningkat. Selain itu durasi pemberian ekstrak yang singkat selama 15 hari juga berpengaruh terhadap penurunan gula darah.

Penurunan kadar gula yang bervariasi mungkin juga di sebabkan oleh faktor endogen dari masing-masing mencit yang bersifat individual dan banyak dipengaruhi oleh beberapa faktor non fisik dan lingkungan. Pemberian Vipalbumin® sebagai kontrol positif, dapat dipengaruhi oleh faktor patologik yang bisa menyebabkan obat menurun atau meningkat. Penurunan efek obat mungkin merupakan konsekuensi dari penyerapan yang jelek pada saluran cerna, pembuluh darah atau peningkatan ekspresi melalui ginjal (Setyawan, Rudi. 2010)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. VipAlbumin[®] atau ekstrak albumin ikan gabus (*Channa striata*) mampu memicu aktivitas imunokompeten pada mencit model DM tipe 2. Hal tersebut dibuktikan melalui peningkatan jumlah sel T CD4⁺CD62L⁺ dan CD4⁺CD62L⁺ yang mengindikasikan bahwa sel T naive kembali meningkat.
2. Dosis optimum VipAlbumin[®] yang dapat menurunkan jumlah CD4⁺ dan CD8⁺ adalah 10,4 mg/g BB
3. VipAlbumin[®] atau ekstrak albumin ikan gabus (*Channa striata*) mampu meningkatkan jumlah SDF-1 yang tidak menimbulkan efek toksik pada hepar
4. VipAlbumin[®] mempunyai pengaruh yang signifikan pada penurunan gula darah mencit yang di injeksi STZ dengan dosis 10,4 mg/g BB

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah :

1. Penting dilakukan penelitian lebih lanjut tentang manfaat dan khasiat VipAlbumin[®] pada model mencit yang berbeda.
2. Penting dilakukannya penelitian yang membuktikan tentang hubungan Diabetes Melitus tipe 2 dengan sistem imun.

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam. 2014. Flow Cytometry Protocol and Troubleshooting Tips. (Online), (<http://www.abcam.com/>). Diakses tanggal 16 April 2014 pukul 08.11 WIB.
- Baratawidjaja, Karnen G. dan Rengganis, Iris. 2012. *Imunologi Dasar Edisi 8*. FKUI. Jakarta.
- Baynes, J.W. 1991. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. *Diabetes*. 40: 405-412.
- Brender. F., Burke, A., Richar, M. D. 2005. Limp patient page. *Journal of the american medical association*. 20 : 266-270.
- Buse JB, Polonsky KS and Burant CF. 2003, Type 2 Diabetes Mellitus, in: *Williams Text Book of Endocrinology* 10th Edition, 1427-1429, Saunders,USA.
- Cahyafitri, Raras. 2010. Jumlah Penderita Diabetes di Indonesia Terus Meningkat. (Online), (<http://nationalgeographic.co.id/>). Diakses tanggal 24 September 2014 pukul 05.30 WIB.
- Dorland WA. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi ke-29. Jakarta: EGC,p:931.
- Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, and Lenzen S. 2000. Relative Importance of Transport and Alkylolation for Pancreatic Beta-cell Toxicity of Streptozotocin. *Diabetologia* 43:1528-33.
- Gustaviani R. 2007. *Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Mellitus*. Dalam :Sudoyo AW., Setiyohadi B., Alwi I., Simadibrata MI. (eds) Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid 3. Edisi 4. Jakarta : Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, pp : 1867, 1857-9.
- Hori, S. Dkk. 2003. Control of Regulatory T cell development by the transcription factor Fox P3. *J.Science*. 299: 1057-1061
- Harti, Agnes Sri. 2012. *Imunologi Dasar dan Imunologi Klinis*. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Hidayati. 1999. Study Kadar Albumin, Zn dan TVB Filtrat Ikan Gabus (*Ophiocephalus sriatus*) pada Lama Sterilisasi dan Penyimpanan yang Berbeda. Laporan Penelitian. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. Hal 36. Koneman, E.W.,
- Jan, T. R., Wey S. P., Kuan C. C., Liao M. H., Wu H. Y. 2007. *Derived Sapogenin, Enchange Regulatory T-cell Immunity In The Intestine Of Mice With With Food Allergy*. *J. PlantaMed*. 73:421-426.

- Katzung BG. 2002. *Basic And Clinical Pharmacology* (Farmakologi Dasar Dan Klinik), Edisi III, 585-587, Diterjemahkan Oleh Andrianto, P, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kokovay E, Goderie S, Wang Y, Lotz S, Lin G, Sun Y, *et al.* 2010. Adult SVZ lineage cells home and to leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *J Stem.*; 7: 163-73.
- Kreno, Siti Boedina. 2003. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Lenzen, Sigurd. 2007. Alloxan and Streptozotocin Diabetes. (Online), (<http://www.saw-leipzig.de/>). Diakses tanggal 15 September 2014.
- Linda K., Widyarti, S., dan Rifa'i, M. 2012. Pengaruh Pemebrian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap Peningkatan Jumlah Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada Timus Mencit (*Mus musculus*). Jurusan Biologi FMIPA UB. Malang.
- Masharani, U, Karam, J.H., and German, M.S. 2004. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: Greenspan FS, Gardner DG. Editors. *Basic & Clinical Endocrinology* 7th Ed. New York: McGraw-Hill. P. 658-746.
- Mycek, Mary J. 2001. *Farmakologi: Ulasan bergambar* Ed.2. Jakarta: WidyaMedika.
- Otero L, Zurita M, Bonilla C, Rico MA, Aguayo C, Rodriguez A, *et al.* 2012. Endogenous neurogenesis after intracerebral hemorrhage. *Histol Histopathol.*; 27: 1-13
- Pathak S, Dorfmueller HC, Borodkin VS, and Aalten MF. 2008 . Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death. *Pubmed Central J.* August 25; 15(8): 799–807.
- Paul, W.E. 2008. *Fundamental Immunology* Sixth Edition. Lippincott & Wilkins. USA.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Universitas Indonesia. Jakarta
- Rahman, M. 2006. *Introduction to Flow Cytometri*. Serotec Ltd. UK.
- Randox. 2014. *Antibody Application: A Guide to the different Techniques in rWich Antibodies are Use*. (online). (<http://www.randox-lifescience.com/>). Diakses pada tanggal 25 September 2014.

- Rifa'i, M. 2010. Andrographolide Ameliorate Rheumatoid Arthritis by Promoting the Development of Regulatory T Cells. *Journal of Tropical Life Science*. 1 (1) pp 5-8
- Roitt, I.M. 2003. *Essential Immunology*. Blackwell Science Limited. Oxford.
- Rosa, S. 2004. *Performa Reproduksi Induk Mencit (Mus musculus) Oleh Penambahan Bawang Putih (Allium sativum) dalam Pakan pada Masa Bunting dan Laktasi*. Skripsi. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Santoso BI. (ed). 2001. *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem*. Jakarta: EGC, pp:663-676.
- Setyawan, Rudi. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa L*) Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Di induksi Aloksan. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Scobie, I.N. 2007. *Atlas of Diabetes Mellitus*. 3rd Ed. London. Informa UK.
- Stumvoll *et al*. 2005. *Type 2 Diabetes : principles of pathogenesis and therapy*. Lancet. 365: 1333-46.
- Sujudi. 2006. Buku Ajar Edisi Revisi Mikrobiologi kedokteran. Bina Rupa Aksara. Tangerang.
- Suprayitno, E. 2003. Penyembuhan Luka dengan Ikan Gabus. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang
- Syamsudin, Rita, D. Marletta & Kusmardi. 2008. Immunomodulatory and in vivo antiplasmodial activities of propolis extract. *Global Journal of Pharmacology*. Vol. 2, no.3. pp. 37-40.
- Szkudelski T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res*. 50: 536-546.
- Tedder, T.F., D.A. Steeber, A. Chen, & P. Engel. 1995. The Selectins: Vascular Adhesion Molecules. *FASEB J*. 9, 866-873.
- Tuner, Donnel C dan Bagnara Joseph T. 1988. Endokrinologi Umum. Alih bahasa Drs. Harjoso. Yogyakarta: Airlangga press
- Waspadji, S. 2000. Telaah Mengenai Hubungan Faktor Metabolik dan Respon Imun pada Pasien Diabetes Melitus tipe 1 : Kaitannya dengan Ulkus/gangren Diabetes. Program Pascasarjana Universitas Indonesia. JKPKBPPK/Badan Litbang Kesehatan. Available from: [http:// digilib. litbang. depkes. go.id /go. php?id=jkpkbpppk-gdlres- 2000-sarwono-389-gangren](http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?id=jkpkbpppk-gdlres-2000-sarwono-389-gangren). Weir, D.

M. 1990. *Segi praktis Imunologi*. Yulius ES. Jakarta: Binarupa Aksara.

Wahyuni, N. 2009. Perubahan Kadar Interleukin-2, Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺, dan Histopatologi Usus Halus Mencit (Balb/c) Splenectomy Paparan *Salmonella typhi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Woodley M and Whelant A. 1995. *Pedoman Pengobatan*. Jogjakarta: Andioffset Essensia Medica, pp: 36-39.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No:270-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 : UJI EFEKTIVITAS VIP ALBUMIN TERHADAP
PENURUNAN KADAR GLUKOSA DARAH DAN
PROFIL SEL LIMFOSIT T PADA MENCIT Balb/c
MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2

PENELITI : GANYS TRI SILVANA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 5 November 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 2. LT1. Hasil Uji Normalitas dengan menggunakan Test of Normality

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4	kontrol -	.201	5	.200*	.919	5	.522
	kontrol +	.188	5	.200*	.962	5	.818
	Low	.227	5	.200*	.897	5	.395
	Optimum	.203	5	.200*	.978	5	.922
	High	.147	5	.200*	.985	5	.957
CD8	kontrol -	.211	5	.200*	.963	5	.831
	kontrol +	.229	5	.200*	.945	5	.702
	Low	.195	5	.200*	.976	5	.911
	Optimum	.217	5	.200*	.928	5	.582
	High	.308	5	.136	.859	5	.226
CD462L	kontrol -	.197	5	.200*	.945	5	.702
	kontrol +	.199	5	.200*	.923	5	.552
	Low	.217	5	.200*	.922	5	.545
	Optimum	.300	5	.161	.900	5	.408
	High	.143	5	.200*	.988	5	.974
CD862L	kontrol -	.185	5	.200*	.945	5	.705
	kontrol +	.328	5	.085	.823	5	.124
	Low	.308	5	.135	.871	5	.271
	Optimum	.254	5	.200*	.845	5	.180
	High	.218	5	.200*	.926	5	.571
SDF	kontrol -	.298	5	.167	.852	5	.200
	kontrol +	.242	5	.200*	.937	5	.646
	Low	.186	5	.200*	.938	5	.649
	Optimum	.158	5	.200*	.969	5	.868
	High	.300	5	.159	.824	5	.124
CD462L-	kontrol -	.197	5	.200*	.945	5	.702

CD862L-	kontrol +	.199	5	.200*	.923	5	.552
	Low	.217	5	.200*	.922	5	.545
	Optimum	.300	5	.161	.900	5	.408
	High	.143	5	.200*	.988	5	.974
	kontrol -	.185	5	.200*	.945	5	.704
	kontrol +	.328	5	.085	.823	5	.124
	Low	.309	5	.135	.871	5	.271
	Optimum	.254	5	.200*	.845	5	.180
	High	.218	5	.200*	.926	5	.571

a. Lilliefors
Significance
Correction

*. This is a lower
bound of the true
significance.

Lampiran 3. LT2. Hasil analisis ragam ANOVA uji Homogenitas melalui softwre SPSS 16.0 for Windows

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD4	.219	4	20	.925
CD8	1.583	4	20	.218
CD462L	.368	4	20	.828
CD862L	2.705	4	20	.060
SDF	13.944	4	20	.000
CD462L-	.368	4	20	.828
CD862L-	2.701	4	20	.060

Lampiran 4. LT3. Hasil analisis ANOVA melalui softwre SPSS 16.0 for Windows

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CD4	Between Groups	102.598	4	25.650	10.542	.000
	Within Groups	48.663	20	2.433		
	Total	151.261	24			
CD8	Between Groups	26.088	4	6.522	5.075	.005
	Within Groups	25.702	20	1.285		
	Total	51.790	24			
CD462L	Between Groups	1456.369	4	364.092	6.384	.002
	Within Groups	1140.597	20	57.030		
	Total	2596.965	24			
CD862L	Between Groups	1478.365	4	369.591	5.741	.003
	Within Groups	1287.573	20	64.379		
	Total	2765.938	24			
SDF	Between Groups	51.645	4	12.911	3.455	.027
	Within Groups	74.731	20	3.737		
	Total	126.376	24			
CD462L-	Between Groups	1456.369	4	364.092	6.384	.002
	Within Groups	1140.597	20	57.030		
	Total	2596.965	24			
CD862L-	Between Groups	1478.626	4	369.656	5.743	.003
	Within Groups	1287.397	20	64.370		
	Total	2766.023	24			

Lampiran 5. LT4. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD4⁺ pada organ lymph node melalui softwre SPSS 16.0 for Windows

CD4

Tukey HSD			
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol -	5	7.3740	12.6900
High	5	7.4140	
Optimum	5	7.6200	
Low	5	8.5420	
kontrol +	5		12.6900
Sig.		.760	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 6. LT5. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD8⁺ pada organ *lymph node* melalui softwre SPSS 16.0 for Windows

CD8

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol -	5	2.7460	
High	5	4.0860	4.0860
Optimum	5	4.6700	4.6700
Low	5		5.0680
kontrol +	5		5.7740
Sig.		.092	.169

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 7.LT6. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif sel T CD4⁺CD62L⁺ dan CD4⁺CD62L⁻ pada organ *lymph node* melalui softwre SPSS 16.0 for Windows

CD462L

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol +	5	39.1920	
Low	5		53.7360
Optimum	5		54.2800
High	5		58.8940
kontrol -	5		61.0380
Sig.		1.000	.557

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**LT7. Hasil analisis jumlah relatif sel T CD4⁺CD62L⁻
CD462L-**

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol -	5	38.9620	
High	5	41.1060	
Optimum	5	45.7200	
Low	5	46.2640	
kontrol +	5		60.8080
Sig.		.557	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 8. LT8. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey
HSD jumlah relatif sel T CD8⁺CD62L⁺ dan
CD8⁺CD62L⁻ pada organ *lymph node* melalui softwre
SPSS 16.0 for Windows**

CD862L

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol +	5	37.0620	
Low	5	48.1760	
kontrol -	5	49.5820	
High	5		
Optimum	5		
Sig.		.138	.288

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

LT9. Hasil analisis jumlah relatif sel T CD8⁺CD62L⁻

CD862L-

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Optimum	5	41.5200	
High	5	42.7200	
kontrol -	5	50.4160	50.4160
Low	5	51.8220	51.8220
kontrol +	5		62.9380
Sig.		.288	.138

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 9. LT10. Hasil analisis ragam ANOVA uji lanjut Tukey HSD jumlah relatif SDF-1 pada organ hepar melalui softwre SPSS 16.0 for Windows yang sudah di transformasi

transform_SDF

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
kontrol +	5	.0660	
Low	5	.0768	.0768
Optimum	5	.0810	.0810
kontrol -	5	.1015	.1015
High	5		.1031
Sig.		.061	.243

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.