

**BIOAKTIVITAS EKSTRAK ETANOL PROPOLIS  
TERHADAP SEL T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> DAN SITOKIN IFN- $\gamma$   
MENCIT BALB/C**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**YONNA AYUNDRIA**  
**105090100111016**



**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2014**

**BIOAKTIVITAS EKSTRAK ETANOL PROPOLIS  
TERHADAP SEL T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> DAN SITOKIN IFN- $\gamma$   
MENCIT BALB/C**

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**YONNA AYUNDRIA  
105090100111016**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**BIOAKTIVITAS EKSTRAK ETANOL PROPOLIS  
TERHADAP SEL T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> DAN SITOKIN IFN- $\gamma$   
MENCIT BALB/C**

Oleh :

**YONNA AYUNDRIA**  
**105090100111016**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal  
20 Juni 2014 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing Skripsi

**Muhaimin Rifa'i, S.Si., Ph.D., Med.Sc**  
**19680626.199702.1.001**

Mengetahui.

**Ketua Program Studi S1, Jurusan Biologi**  
**Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D**  
**NIP. 19700128.199412.2.001**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Yonna Ayundria  
NIM : 105090100111016  
Jurusan : Biologi  
Penulis Skripsi berjudul : Bioaktivitas Ekstrak Etanol  
Propolis terhadap Sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan Sitokin IFN- $\gamma$  Mencit  
Balb/C

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.
2. Apabila dikemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.  
Denikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 Juni 2014

Yang menyatakan,

( Yonna Ayundria )  
NIM. 105090100111016

## 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 seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# Bioaktivitas Ekstrak Etanol Propolis terhadap Sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan Sitokin IFN- $\gamma$ Mencit Balb/C

Yonna Ayundria<sup>1</sup> dan Muhaimin Rifa'<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang

## ABSTRAK

Propolis adalah adalah zat resin yang dikumpulkan oleh lebah madu dari eksudat dan tunas tanaman, di olah dengan enzim dari lebah dan lilin pada sarang. Propolis mengandung bahan kimia kompleks yang kaya berbagai bahan imunomodulator, salah satunya flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh EEP terhadap perubahan jumlah relatif subset sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, serta dosis optimal untuk meningkatkan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> pada mencit Balb/c secara in vivo. Tahapan penelitian meliputi aklimasi hewan coba selama  $\pm$  1 minggu, penyiapan Ekstrak Etanol Propolis/EEP, *Oral Treatment* dengan dosis 0 mg/kg BB = K ; 50 mg/kg BB = DI ; 100 mg/kg BB = DII ; 200 mg/kg BB =DIII selama 2 minggu, isolasi organ spleen dan analisis *flowcytometry*. Data di uji statistik non parametrik (Kruskall Wallis  $P < 0,05$ , dilanjutkan uji Mann Whitney). Analisa data dilakukan menggunakan program SPSS 16.0 *for windows*. Hasil yaitu pemberian EEP dosis I meningkatkan proliferasi sel T CD8<sup>+</sup> dan produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh sel T CD8<sup>+</sup> secara signifikan dibandingkan kontrol. Pada dosis yang sama, jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> juga meningkat namun tidak signifikan. Akan tetapi pada dosis ini, produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh sel T CD4<sup>+</sup> terjadi penurunan secara signifikan. Berdasarkan hal tersebut, diduga EEP berperan dalam menjaga keseimbangan jumlah sitokin IFN- $\gamma$ . Dosis III menyebabkan penurunan secara signifikan jumlah relatif T CD4<sup>+</sup> dan produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh T CD4<sup>+</sup>. Dosis optimal untuk meningkatkan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> adalah 50 mg/kg BB.

Kata kunci : IFN- $\gamma$ , imunomodulator, propolis, sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>

# Bioactivity Ethanolic Extract of Propolis to CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T Cells and IFN- $\gamma$ Cytokine in Balb/C Mice

Yonna Ayundria<sup>1</sup> and Muhaimin Rifa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya Malang

## ABSTRACT

Propolis is a resinous substance which collected by honey bees from buds and exudates of plants, modified with enzymes of bees and wax from the hive. Propolis contains chemicals complex due its biological effect namely immunomodulatory, such as flavonoids. This study aims to determine the effects of EEP to changes the relative number of T-cell subsets of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$  cytokine production by CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T cells, and optimal dose to increase relative number of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells in Balb/c mice by vivo. Stages of research includes animal acclimation for  $\pm$  1 week, preparation of Ethanolic Extract of Propolis / EEP, Oral Treatment with various doses: 0 mg/kg BW = K; 50 mg/kg BW = DI; 100 mg/kg BW = DII; 200 mg/kg BW = DIII for 2 weeks, isolation spleen cells and flowcytometry analysis. Data analysis in nonparametric (Kruskall Wallis  $P < 0.05$ , followed with Mann Whitney test). Data analysis was performed using SPSS 16.0 for Windows. The result showed that first dose of EEP increased CD8<sup>+</sup> T cells proliferation and IFN- $\gamma$  cytokine production by CD8<sup>+</sup> T cells significantly compared to controls. At the same dose, the relative number of CD4<sup>+</sup> T cells were not significantly increased. However, IFN- $\gamma$  cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells were significantly decreased. Based on this, EEP was expected as its role to maintain the balance of IFN- $\gamma$  cytokine. Third dose caused decreased the relative number of CD4<sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$  cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells significantly. Optimal dose to increase the relative number of CD8<sup>+</sup> T cells was 50 mg/kg BW.

Keywords : IFN- $\gamma$ , immunomodulator, propolis, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Tcells

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufik dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Bioaktivitas Ekstrak Etanol Propolis terhadap Sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan Sitokin IFN- $\gamma$  Mencit Balb/C”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya.
  2. Bapak Muhaimin Rifa'i, S.Si.,Phd.,Med.Sc selaku pembimbing atas bimbingannya dalam menyelesaikan skripsi.
  3. Bapak Dr.Ir.Moch.Sasmito Djati., MS dan Drs. Aris Soewondo.,MS selaku dosen penguji I dan II.
  4. Bapak Sudiono dan Ibu Gunarmi selaku Orang Tua penulis yang tidak jenuh-jenuhnya / mengirimkan doa, dan memberikan motivasi untuk menyelesaikan skripsi ini.
  5. Mas Riza, Dik Yunan, Mbak Mega dan Keluarga di Blitar selaku saudara penulis atas doa dan dukungannya.
  6. Teman-teman seperjuangan dan sahabat karib Biologi Angkatan 2010 : Aden, Lia, Prita, Riza, Indriya,Dwi, Wardah, Qonita, Emi, Yuyun, Arif dan mbak Dini atas bantuannya.
  7. Rekan-rekan Laboratorium : Mbak Dewi, Mas Bambang, Mbak Ririn atas bantuannya.
  8. Semua pihak yang mendukung terselesaikannya skripsi ini.
- Demikian skripsi ini penulis buat, semoga dapat memberikan manfaat bagi semua pihak. Penulis menyadari bahwa di dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kekurangan untuk itu kritik dan saran yang membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan

Malang, 20 Juni 2014  
Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	2
1.3. Tujuan.....	3
1.4. Manfaat.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1. Sistem imunitas tubuh dan immunomodulator .....	4
2.2. Sistem imunitas spesifik.....	4
2.2.1 Sitokin.....	6
2.3. Organ limfoid dan Spleen.....	7
2.4. Tinjauan Umum Propolis .....	8
2.4.1. Lebah <i>Trigona</i> sp. ....	8
2.4.2. Sifat fisik propolis.....	9
2.4.3. Komposisi kimia propolis .....	10
2.5. Ekstraksi Propolis.....	11
2.6. Aktivitas Immunomodulator Propolis .....	11
2.7. Analisis Kuantitatif menggunakan <i>Flow-cytometry</i> .....	12
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	13
3.1. Jenis Penelitian .....	13
3.2. Waktu dan tempat.....	13
3.3. Prosedur Kerja Penelitian .....	13

3.3.1. Deskripsi Hewan Coba dan Estimasi Besar Sampel .....	13
3.3.2. Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan .....	13
3.4. Aklimasi Hewan Coba .....	14
3.5. Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis (EEP) .....	14
3.6. Penyiapan Ekstrak dan <i>Oral Treatment</i> pada Mencit Kelompok Perlakuan.....	14
3.7. Isolasi Organ Limfoid .....	15
3.8. Analisis Flowcytometry .....	15
3.9. Analisis Data .....	16
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	17
4.1. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> dan T CD8 <sup>+</sup> .....	17
4.1.1. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	17
4.1.2. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD8 <sup>+</sup> .....	19
4.2. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD8 <sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$ .....	21
4.3. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$ .....	24
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	27
5.1. Kesimpulan.....	27
5.2. Saran.....	27
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	28
<b>LAMPIRAN</b> .....	32

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Sistem imunitas spesifik .....	6
Gambar 2.2. Organisasi jaringan sel spleen .....	7
Gambar 2.3. (I) Propolis yang dibawa oleh lebah di bagian kaki belakang ; (II) (A) Propolis; (B) Lebah; (C) Propolis yang dibawa oleh lebah di bagian kaki belakang; (D) Sarang bagian dalam. ....	9
Gambar 4.1. Jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> .....	17
Gambar 4.2. Persentase jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> dan sel T CD8 <sup>+</sup> .	18
Gambar 4.3. Jumlah relatif Sel T CD8 <sup>+</sup> .....	20
Gambar 4.4. Jumlah relatif Sel T CD8 <sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$ . ....	22
Gambar 4.5. Persentase jumlah relatif sel T CD8 <sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$ .....	23
Gambar 4.6. Jumlah relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$ . ....	24
Gambar 4.7. Persentase jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$ .....	25

## DAFTAR TABEL

Tabel.2.1. Bentuk propolis pada berbagai temperature .....	10
Tabel 3.1. Kelompok Penelitian .....	14
Tabel LT 3.1. Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> .....	34
Tabel LT 3.1.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DI.....	34
Tabel LT 3.1.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII....	35
Tabel LT 3.1.3 Uji Mnn Whitney antara kelompok kontrol-DIII... ..	36
Tabel LT 3.1.4 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII.....	36
Tabel LT 3.1.5 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII.....	37
Tabel LT 3.1.6 Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII.....	38
Tabel LT 4.1 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T CD8 <sup>+</sup> .....	39
Tabel LT 4.1.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DI.....	39
Tabel LT 4.1.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII....	40
Tabel LT 4.1.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DIII ..	41
Tabel LT 4.1.4 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII.....	41
Tabel LT 4.1.5 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII.....	42
Tabel LT 4.1.6 Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII .....	43
Tabel LT 5.1 Uji Kruskall Wallis jumlah relatif sel T CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ ..	44
Tabel LT 5.1.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DI.....	44
Tabel LT 5.1.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII....	45
Tabel LT 5.1.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DIII ..	46
Tabel LT 5.1.4 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII.....	46
Tabel LT 5.1.5 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII.....	47
Tabel LT 5.1.6 Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII .....	48
Tabel LT 6.1 Uji Kruskall Wallis jumlah relatif sel T CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ ..	49
Tabel LT 6.1.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DI.....	49
Tabel LT 6.1.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII....	50
Tabel LT 6.1.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DIII ..	51
Tabel LT 6.1.4 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII.....	51
Tabel LT 6.1.5 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII.....	52
Tabel LT 6.1.6 Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII .....	53

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Konsep Penelitian.....	32
Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian.....	33
Lampiran 3. Hasil analisis Kruskal Wallis, uji lanjut Mann Whitney jumlah relatif sel T CD4+ .....	34
Lampiran 4. Hasil analisis Kruskal Wallis, uji lanjut Mann Whitney jumlah relatif sel T CD8+ .....	39
Lampiran 5. Hasil analisis Kruskal Wallis, uji lanjut Mann Whitney jumlah relatif sel T CD8+ yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$ .....	44
Lampiran 6. Hasil analisis Kruskal Wallis, uji lanjut Mann Whitney jumlah relatif sel T CD4+ yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$ .....	49



## DAFTAR SINGKATAN

1. APC : *Antigen Presenting Cell*
2. CAPE : *Cafeic Acid Phenethyl Esther*
3. EEP : *Ekstrak Etanol Propolis*
4. GM-CSF : *Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor*
5. IFN- $\gamma$  : *Interferon gamma*
6. IL-10 : *Interleukin-10*
7. IL-13 : *Interleukin-13*
8. IL-2 : *Interleukin-2*
9. IL-4 : *Interleukin-4*
10. IL-5 : *Interleukin-5*
11. IL-6 : *Interleukin-6*
12. IL-7 : *Interleukin-7*
13. IL-9 : *Interleukin-9*
14. MHC : *Major Histocompatibility Complex*
15. Tc : *T cytotoxic*
16. TCR : *T Cell Antigen Receptor*
17. Th : *T helper*
18. TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Indonesia menyimpan Sumber Daya Alam (SDA) berupa bahan alam yang berlimpah. Namun, sebagian besar belum dikaji khasiatnya secara ilmiah. Penggunaan bahan alam memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Pengobatan herbal memiliki efek samping rendah dibandingkan sintetis. Pembuktian manfaat bahan alam sebagai sumber obat herbal perlu digalakkan melalui uji klinik yang didukung dengan penelitian imunologis baik melalui penilaian kualitatif maupun kuantitatif. Beberapa bahan alam memiliki potensi sebagai imunomodulator yaitu suatu bahan yang dapat memperbaiki atau mengembalikan gangguan pada sistem imun atau menekan adanya fungsi yang berlebihan, sehingga mempertahankan keseimbangan (homeostasis) sistem imun (Nazir, 2013).

Salah satu bahan alam Indonesia yang menjanjikan sebagai sumber obat baru adalah propolis. Propolis atau "*bee glue*" adalah zat resin yang dikumpulkan oleh lebah dari eksudat dan tunas tanaman, diolah dengan enzim yang dikeluarkan oleh lebah dan dicampur dengan lilin yang ada dalam sarang. Lebah menggunakan propolis sebagai bentuk pertahanan diri untuk melindungi sarangnya dari berbagai ancaman baik ancaman lingkungan ataupun serangan organisme lainnya serta mencegah perkembangan dan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh mikroba (Suranto, 2007).

Propolis telah lama dikenal dan digunakan sebagai obat tradisional yang memiliki berbagai efek menguntungkan diantaranya immunomodulator, antitumor, antibakteri, antijamur antiinflamasi, antioksidan dan lain sebagainya (Murad, dkk., 2002; Hu, dkk., 2005; Orsi, dkk., 2005; Freitas, dkk., 2006; Sforcin, 2007; Girgin, dkk., 2009). Bahkan produk lebah ini secara khusus disebut dalam kitab suci umat Islam (Al-Quran) sebagai obat bagi manusia (An-Nahl : 68-69).

Propolis mengandung bahan kimia kompleks yang sangat kaya berbagai bahan immunomodulator potensial diantaranya asam fenolat, flavonoid dan CAPE (Challem, 2004). Komposisi kimia propolis sangat bervariasi antar wilayah tergantung dari sumber tanaman (Bankova, dkk., 2000).

Menurut Park, dkk, (2004), pemberian senyawa CAPE pada propolis dosis 20 mg/kg BB selama 2 minggu pada mencit mampu meningkatkan produksi sitokin IL-2, IL-4, dan IFN- $\gamma$ , serta rasio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Sitokin IL-2 yang diproduksi oleh sel Th1 mampu mengaktifasi proliferasi sel Th1, menstimulasi sel Tc/ sel T sitotoksik, sel T regulator dan produksi antibodi (Nelson, 2004).

Penelitian lain menunjukkan bahwa pemberian ekstrak propolis dosis 100 mg/kg BB selama 1 minggu pada mencit mampu menghambat produksi sitokin IL-2, IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  sebagai respon anti-inflamasi (Fatahina, dkk., 2012). IFN- $\gamma$  merupakan sitokin pro-inflamasi yang disekresi oleh sel Th1 setelah dirangsang oleh antigen spesifik, berperan baik dalam imunitas spesifik maupun nonspesifik, (Baratatawidjaja & Rengganis, 2010). Peran sitokin IFN-  $\gamma$  dalam imunitas spesifik yaitu meningkatkan diferensiasi sel CD4<sup>+</sup> naïve ke subset sel Th1 dan menghambat proliferasi sel Th2 (Baratatawidjaja & Rengganis, 2010; Schinkel, 2003 ; Romagnani, 2005). Menurut penelitian Tazulakhova, dkk, (2001) dan Missima, dkk, (2009) menyatakan bahwa senyawa flavonoid ilmiah dapat memodulasi produksi sitokin IFN-  $\gamma$ . Namun, hingga saat ini belum mampu dijelaskan bagaimana aktivitas fraksi propolis mempengaruhi respon imun tubuh.

Propolis merupakan salah satu immunomodulator alam yang banyak terdapat dan dibudayakan di Indonesia, salah satunya di Lawang, Kabupaten Malang. Propolis Lawang dihasilkan oleh lebah *Trigona* sp. Namun, hingga saat ini belum banyak data penelitian yang mengkaji aktivitas immunomodulator propolis Indonesia. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian tentang potensi propolis Indonesia sebagai immunomodulator. Penelitian ini dilakukan melalui pengukuran kuantitas subset sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, serta IFN-  $\gamma$  sebagai sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan sel T CD8<sup>+</sup> dan T CD4<sup>+</sup>.

## **1.2. Rumusan Masalah**

1. Bagaimanakah pengaruh ekstrak etanol propolis terhadap perubahan jumlah relatif subset sel T CD4<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup>,dan produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh subset sel T CD8<sup>+</sup> ,CD4<sup>+</sup> pada mencit Balb/c?



2. Berapakah dosis optimal ekstrak etanol etanol propolis untuk meningkatkan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> pada mencit Balb/c?

### **1.3. Tujuan**

1. Mengetahui pengaruh ekstrak etanol propolis terhadap perubahan jumlah relatif subset sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> dan produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh subset sel T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> pada mencit Balb/c.
2. Mengetahui dosis optimal ekstrak etanol propolis untuk meningkatkan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> pada mencit Balb/c.

### **1.4. Manfaat**

1. Menambah daftar tanaman obat Indonesia yang berkhasiat sebagai immunomodulator.
2. Dasar penelitian lebih lanjut sebagai tanaman obat Indonesia yang berkhasiat sebagai immunomodulator.
3. Menyediakan informasi bagi masyarakat mengenai potensi propolis sebagai alternatif obat berbahan dasar alam, sehingga meningkatkan khasanah tanaman obat herbal Indonesia.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Sistem imunitas tubuh dan immunomodulator**

Sistem imunitas adalah rangkaian sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap substansi asing (Abbas & Lichtman, 2005). Invasi substansi asing/ antigen seperti mikroba akan menimbulkan respon, disebut respon imun. Sistem imun diperlukan bagi tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup.

Keseimbangan atau homeostasis sistem imun tubuh merupakan hasil dari mekanisme immunomodulator. Immunomodulator adalah suatu bahan yang dapat memperbaiki atau mengembalikan gangguan pada sistem imun atau menekan adanya fungsi yang berlebihan, sehingga mempertahankan keseimbangan sistem imun. Immunomodulator dibedakan menjadi dua yaitu immunostimulator (meningkatkan sistem imun) dan immunosupresor (menekan sistem imun) (Nazir, 2013). Kerja immunomodulator meliputi : (1) mengembalikan fungsi sistem imun tubuh yang terganggu (imunorestorasi), (2) memperbaiki fungsi sistem imun tubuh (immunostimulasi), dan (3) menekan respon imun (imunosupresi). Mekanisme immunomodulator melibatkan kerja sistem imunitas seluler dan humoral. Sistem imunitas seluler merupakan bagian dari sistem imunitas spesifik.

#### **2.2. Sistem imunitas spesifik**

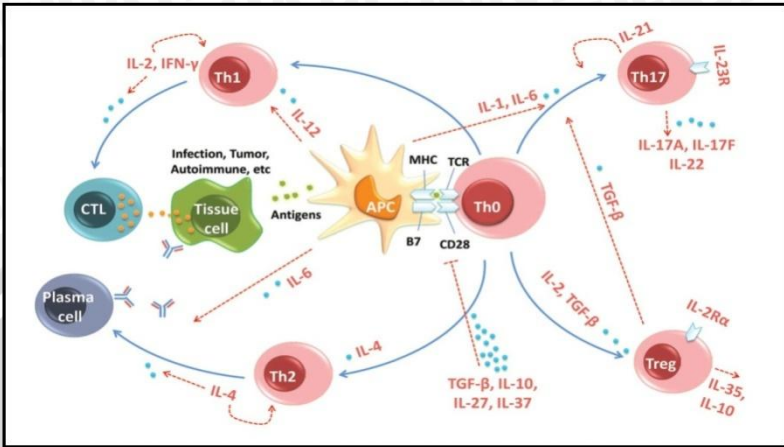
Sistem ini dikatakan sebagai sistem imunitas spesifik dikarenakan targetnya berupa mikroba spesifik, dan mekanisme imunitasnya menunjukkan spesifitas terhadap substansi asing. Paparan antigen sama untuk kedua kalinya akan menimbulkan sensitasi, sehingga lebih cepat dalam pengenalan dan penghancuran antigen. Sistem imun spesifik terdiri dari sel-sel limfosit yang memproduksi reseptor spesifik terhadap antigen. Sistem imun ini dibedakan menjadi dua yaitu sistem humoral (sel B) dan seluler (sel T) (Baratawidjaya & Rengganis, 2010).

Sistem imunitas spesifik seluler terdiri dari sel limfosit T/sel T. Sel T adalah sel hasil diferensiasi sel progenitor asal sumsum

tulang yang bermigrasi dan mengalami pemasakan di timus. Sel limfosit terdiri sel T (55-84%) dan B (6-25%) (Virella, 2001).

Menurut Abbas dan Lichtman (2005), sel T dibagi menjadi dua diantaranya sel Th dan Tc. Sel Th adalah sel T yang berperan dalam stimulasi antibodi dan aktivasi makrofag dengan mengekspresikan molekul, disebut sitokin. Permukaan membran sel Th mengekspresikan molekul CD4, selanjutnya disebut sel T CD4<sup>+</sup>. Sel T CD4<sup>+</sup> memiliki reseptor antigen TCR yang dapat mengenali epitop antigen melalui kerjasama dengan molekul protein permukaan pada APC yaitu MHC kelas II (Abbas & Lichtman, 2005). Sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi Th 1 dan Th 2, tergantung tipe stimulan terutama sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Th1 mensekresi sitokin IL-2, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ , sedangkan Th2 yang teraktivasi memproduksi sitokin-sitokin seperti IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 dan GM-CSF (Baratawidjaya & Rengganis, 2010).

Sel Tc/sel T sitotoksik adalah sel limfosit yang berperan dalam menghancurkan sel yang terinfeksi patogen intraseluler seperti virus. Permukaan membran sel Tc mengekspresikan molekul CD8, selanjutnya disebut sel T CD8<sup>+</sup>. Sel T CD8<sup>+</sup> memiliki reseptor antigen TCR/ *T Cell Antigen Receptor* yang dapat mengenali epitop suatu antigen melalui kerjasama dengan molekul protein permukaan pada APC yaitu MHC kelas I (Abbas & Lichtman, 2005). Menurut Rifa'i, dkk, (2004) sel T CD8<sup>+</sup> yang mengekspresikan rantai reseptor IL-2/IL-5 atau CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> berfungsi sebagai sel T regulator dimana aktivitasnya meregulasi sel-sel sistem imun pada mencit model defisiensi CD122. Sel CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> mampu meregulasi granulosit, sel B, dan mengontrol populasi sel CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>.



Gambar 2.1. Sistem imunitas spesifik (Wu, dkk.,2014)

### 2.2.1. Sitokin

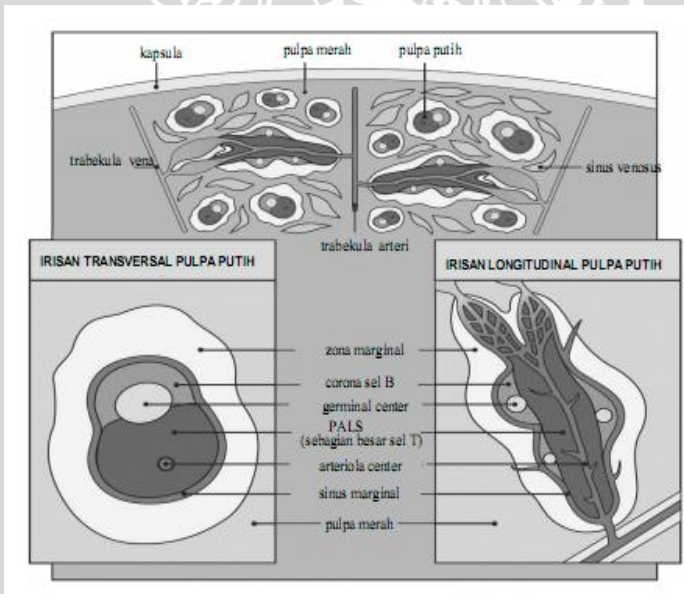
Sitokin adalah glikoprotein atau protein ekstraseluler terlarut yang diproduksi oleh sel-sel dalam sistem imun, berperan sebagai *chemical messengers*. Sel-sel dalam sistem imun berkomunikasi satu sama lain berdasarkan respon dari sitokin. Sitokin diklasifikasikan menjadi interleukin, interferon dan kemokin (Spelman, dkk., 2006). Dalam kondisi fisiologis, sitokin berfungsi (1). Aktivasi sel-sel dalam sistem imun, misalnya IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang diproduksi Th1 dapat menstimulasi sel Tc, (2) stimulasi dalam hematopoiesis, misalnya IL-3 dan IL-7 dalam stimulasi pertumbuhan sel progenitor limfosit, (3) proses inflamasi, misalnya IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ , (4) agen imunomodulasi (Wahab & Hussain, 2013). Pengelompokan sitokin juga didasarkan pada fungsinya sebagai mediator sistem imun spesifik atau non spesifik (Wahab & Hussain, 2013).

Salah satu sitokin yang berperan sebagai mediator baik dalam sistem imun spesifik dan non spesifik adalah sitokin IFN- $\gamma$ . Sitokin IFN- $\gamma$  diproduksi terutama oleh sel Th 1, namun sel-sel T lain dan sel NK juga memproduksinya dalam jumlah kecil. Dalam imunitas non spesifik, sitokin IFN- $\gamma$  berfungsi dalam aktivasi sel makrofag, sedangkan dalam imunitas spesifik berfungsi menstimulasi diferensiasi sel Th 1 (Wahab & Hussain, 2013).

### 2.3. Organ limfoid dan *Spleen*

Organ limfoid dalam sistem imun dibagi menjadi dua yaitu organ limfoid primer dan sekunder. Organ limfoid primer merupakan organ sebagai tempat produksi sel limfosit, misalnya sumsum tulang (*bone marrow*) dan timus, sedangkan organ limfoid sekunder merupakan organ tempat pematangan sel limfosit dan interaksi dengan antigen pada sistem imun, misalnya spleen, lymph node, tonsil, dan adenoid.

Spleen atau biasa dikenal dengan limpa adalah organ yang terletak di belakang lambung dan bertugas dalam mengumpulkan antigen dari darah. Organ spleen dibedakan menjadi dua daerah yaitu daerah pulpa putih dan pulpa merah (tempat penghancuran sel-sel darah merah). Pulpa putih adalah tempat berkumpulnya sel B dari arteri dan sekitarnya. Disisi lain, terdapat daerah tertentu pada pulpa putih yang disebut *periarteriolar lymphoid sheath* (PALS) yang mana berguna sebagai tempat berkumpulnya sel T (Baratawidjaya & Rengganis, 2010).



Gambar 2.2. Organisasi jaringan sel spleen (Baratawidjaya & Rengganis, 2010)

## 2.4. Tinjauan Umum Propolis

Propolis atau “*bee glue*” adalah zat resin yang dikumpulkan oleh lebah dari eksudat dan tunas tanaman, diolah dengan enzim yang dikeluarkan oleh lebah dan dicampur dengan lilin yang ada dalam sarang. Lebah menggunakan propolis sebagai bentuk pertahanan diri untuk melindungi sarangnya dari berbagai ancaman baik ancaman lingkungan yang tidak menguntungkan ataupun serangan organisme lainnya serta mencegah perkembangan dan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh mikroba. Propolis berasal dari bahasa Yunani, yakni *pro* berarti ‘di depan’ dan *polis* berarti ‘kota’, sehingga istilah ini menggambarkan kegunaannya sebagai zat pelindung di pintu masuk sarang lebah, baik terhadap invansi serangga lain maupun lingkungan yang tidak menguntungkan (Suranto, 2007)

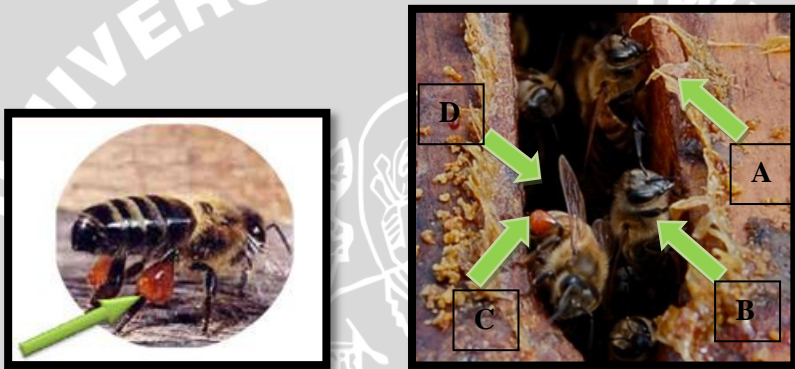
Menurut Siregar, dkk, (2011), propolis memiliki fungsi yang unik bagi lebah diantaranya dapat memperkuat stabilitas struktural sarang lebah, mengurangi getaran yang berasal dari luar sarang, melindungi sarang lebah dengan cara menambah celah-celah yang rusak, mencegah parasit dan penyakit masuk ke dalam sarang serta mencegah pembusukan dalam sarang.

### 2.4.1. Lebah *Trigona* sp.

Salah satu genus spesialis penghasil propolis adalah lebah *Trigona* sp. (Siregar, dkk., 2011). *Trigona* sp. merupakan lebah asli Asia dan bersifat tidak berbahaya (Mahani, dkk., 2011). Lebah ini tergolong famili Meliponidae, tidak memiliki sengat dan ukuran tubuhnya lebih kecil dibandingkan lebah dari genus *Apis*. Kompensasi tiadanya sengat, menyebabkan lebah jenis ini memproduksi lebih banyak propolis sebagai bentuk pertahanan diri. Oleh karena itu, lebah *Trigona* sp. menghasilkan lebih banyak propolis dibandingkan madu. Penelitian yang dilakukan di IPB menunjukkan bahwa propolis yang dihasilkan oleh lebah *Trigona* sp. memiliki kadar flavonoid mencapai 4% dibandingkan propolis *Apis* yang hanya 1,5% (Maulana, 2010).

Salah satu hal yang harus diperhatikan dalam budidaya lebah penghasil propolis adalah ketersediaan pohon penghasil getah, sebab getah merupakan sumber resin sebagai bahan utama propolis. Peternakan lebah Rimba Raya Lawang, Kabupaten Malang

merupakan salah satu tempat yang mendukung bagi budidaya lebah *Trigona* sp. penghasil propolis, sebab berada di area yang dikelilingi berbagai tanaman bergetah seperti *Ceiba pentandra* (kapuk randu), *Melaleuca leucadendra* (kayu putih), dan *Albizia chinensis* (sengon). Lebah mengambil getah dari bunga dan tunas tanaman dengan mandibula dan mengumpulkannya dalam kantong sari bunga pada kaki belakang. Diasumsikan bahwa selama proses pengumpulan dan pengolahan getah tersebut, lebah mencampurnya dengan sedikit air ludah dan sekresi lain (Gebara, dkk., 2002).



(I)

(II)

Gambar 2.3. (I) Propolis yang dibawa oleh lebah di bagian kaki belakang ; (II) (A) Propolis; (B) Lebah; (C) Propolis yang dibawa oleh lebah di bagian kaki belakang; (D) Sarang bagian dalam (Welsh, 2012).

#### 2.4.2. Sifat fisik propolis

Warna propolis berkisar dari hijau, merah hingga coklat kehitaman. Bentuk propolis beraneka macam baik cair maupun padat tergantung suhu penyimpanan (tabel 2.1). Semakin tinggi suhu penyimpanan, propolis akan semakin cair (Siregar, dkk., 2011).

Tabel.2.1. Bentuk propolis pada berbagai temperature

Temperatur (°C)	Bentuk Propolis
< 15	Keras dan <i>brittle</i> (rapuh). Tetap <i>brittle</i> meskipun disimpan pada temperatur lebih tinggi.
25 – 45	Lunak, <i>pliable</i> , sangat lengket
>45	Semakin lengket dan <i>gummy</i> (seperti karet)
60-70	Cair
100	Titik cair beberapa jenis propolis

Sumber : Siregar, dkk (2011).

### 2.4.3. Komposisi kimia propolis

Secara umum, komposisi propolis di alam terdiri dari 30% lilin, 50% resin dan balsam, 10% minyak esensial dan aromatik, 5% pollen dan substansi lain (Burdock, 1998). Komposisi kimia propolis sangat kompleks, lebih dari 300 unsur dan zat kimia ditemukan dari berbagai jenis propolis, dimana komposisi kimianya bervariasi tergantung dari sumber tanaman (Bankova, dkk., 2000). Menurut Lotfy (2006), komposisi kimia propolis yang kompleks dan beragam membuat propolis memiliki khasiat yang bermacam-macam diantaranya immunomodulator, antitumor, antibakteri, antijamur antiinflamasi, antioksidan dan lain sebagainya (Murad, dkk., 2002; Hu, dkk., 2005; Orsi, dkk., 2005; Freitas, dkk., 2006; Sforcin, 2007; Girgin, dkk., 2009).

Senyawa utama propolis adalah resin yang terdiri dari flavonoid, ikatan fenol dan berbagai asam (Siregar, dkk., 2011). Resin adalah sistem daya tahan tubuh tanaman. Lebah menghasilkan propolis melalui pencampuran enzim pada air liur lebah dengan resin-resin dari berbagai tanaman, sehingga resin yang dihasilkan berbeda dengan resin asal. Flavonoid bersifat antioksidan dan mampu menumbuhkan jaringan sehingga baik untuk penyembuhan luka. Semakin tinggi kandungan flavonoid akan semakin tinggi pula kecepatan penyembuhan penyakit (Suranto, 2007).

Lilin propolis merupakan lilin lebah yang mengandung ikatan ester, asam lemak, dan rantai alkohol hidrokarbon (Suranto, 2007). Minyak esensial dan aromatik pada propolis sangat beragam tergantung pada jenis tanamannya. Minyak esensial memberikan aroma yang khas dan bersifat mudah menguap (*volatile*) (Siregar,



dkk., 2011). Polen merupakan sumber protein dalam propolis, dimana kandungan asam amino terbanyak yaitu arginin dan prolin sebanyak 45,8%.

## **2.5. Ekstraksi Propolis**

Ekstraksi adalah cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan dengan matriknya menjadi senyawa terlarut. Pemilihan pelarut merupakan aspek yang penting dalam proses ekstraksi secara kimiawi sebab harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diisolasi, dimana sifat yang paling penting adalah polaritas dan gugus polar. Pelarut yang digunakan harus dapat menarik keluar senyawa yang ingin dipisahkan.

Tahapan ekstraksi terdiri dari persiapan bahan mentah, kontak bahan dengan pelarut (maserasi), pemisahan ampas dari materi terekstraksi dan pemisahan pelarut (evaporasi) (Radiati, 2002). Persyaratan ekstraksi propolis harus memperhatikan pemilihan jenis pelarut karena harus aman bagi tubuh. Hal ini dikarenakan hasil produk akhir sebagai bahan konsumsi. Pelarut yang dapat digunakan secara aman adalah etanol atau etil alkohol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) (Krell, 1996).

Metode ekstraksi propolis menggunakan ratio antara berat propolis dengan berat atau volume pelarut. Metode maserasi cocok digunakan untuk ekstraksi bahan yang tidak tahan panas, seperti propolis. Maserasi bertujuan untuk memberikan waktu pelarut dan propolis berinteraksi sehingga pelarut dapat melarutkan senyawa-senyawa aktif propolis yang di ekstraksi. Metode ini diiringi dengan proses pengadukan yang dilakukan sesekali atau terus menerus hingga terjadi keseimbangan antara konsentrasi ekstraksi dengan bahan yang di ekstraksi (Mahanani, dkk., 2011). Filtrat hasil ekstraksi yang terbentuk selanjutnya dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu  $40^\circ\text{C}$  sampai terbentuk pasta ekstrak propolis yang bersifat pekat dan lengket (Mahanani, dkk., 2011)

## **2.6. Aktivitas Immunomodulator Propolis**

Menurut Park, dkk, (2004), pemberian senyawa CAPE pada propolis dengan dosis 20 mg/kg BB selama 2 minggu pada mencit mampu meningkatkan produksi sitokin IL-2, IL-4, dan IFN- $\gamma$ , serta rasio  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ . Sitokin IL-2 yang diproduksi oleh sel Th 1 mampu

mengaktivasi proliferasi sel Th 1, sel B, menstimulasi sel Tc/ sel T sitotoksik, sel T regulator dan produksi antibodi (Nelson, 2004).

Menurut Fatahinia, dkk, (2012) menunjukkan bahwa pemberian propolis dosis 100 mg/kg BB secara oral selama 7 hari mampu menghambat produksi sitokin TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , dan IL-2. Penelitian sama dengan dosis 200 mg/kg BB dalam waktu yang lebih singkat juga menunjukkan efek penghambatan produksi sitokin IFN- $\gamma$  sebagai respon anti-inflamasi (Orsatti, dkk., 2010). Menurut Ansorge dkk, (2003) menunjukkan bahwa propolis mensupresi sintesis DNA pada PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) dan sel T, dimana mekanisme ini dimediasi oleh senyawa CAPE (caffeic acid phenetyl ester), flavonoid, quercetin dan hesperidin.

## **2.7. Analisis Kuantitatif menggunakan *Flow-cytometry***

*Flow cytometry* FACS (*Fluorescens Activated Cell Sorting*) adalah alat penghitung sel *Coulter counter* (menghitung sel menggunakan aliran sel secara otomatis yang dilewatkan detektor). Prinsip dari alat ini yaitu ketika suspensi sel dilewatkan kolom vibrasi sehingga terbentuk *droplet* bermuatan yang mengandung sel tunggal. Aliran *droplet* akan ditembak dengan sinar laser dan sinar yang diteruskan akan ditangkap oleh detektor. Detektor tersebut disambungkan dengan software untuk menganalisis sinyal yang diperoleh sehingga sel dapat dianalisis, dipisahkan, dan dikoleksi.

Visualisasi data dalam *flow cytometry* berguna untuk metode standar pengukuran jumlah absolut limfosit T CD4<sup>+</sup> dan T CD8<sup>+</sup>. Dalam metode ini diperlukan pengikatan antibodi-antigen sel yang spesifik dan penambahan penanda (fluorokrom) seperti phycoerythrin (PE), *fluorescein isothiocyanate* (FITC) dan *peridinin chlorophyl protein* (perCP) dan *Propidium Iodida* (PI). Fluorokrom adalah senyawa fluorescein yang berpendar saat eksitasi oleh sinar panjang gelombang tertentu. Ikatan antibodi terhadap antigen yang dituju harus bersifat spesifik sehingga pelabelan akan memberikan hasil akurat. Pemberian label pada antibodi, maka dapat diketahui ekspresi antigen (protein) (Kiernan,1990).

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Jenis Penelitian

Penelitian bersifat eksperimental dan bertujuan untuk membuktikan aktivitas immunodulator ekstrak etanol propolis terhadap perubahan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan sitokin IFN- $\gamma$  yang diproduksi sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, dan dosis optimal untuk meningkatkan jumlah relatif sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> secara *in vivo* pada mencit Balb/c.

#### 3.2. Waktu dan tempat

Penelitian ini dimulai pada bulan September 2013, bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Farmakologi dan Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

#### 3.3. Prosedur Kerja Penelitian

##### 3.3.1. Deskripsi Hewan Coba dan Estimasi Besar Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit BALB/C (*Mus musculus*) jantan, umur 8 minggu, berat badan  $\pm$  38 gram, dan memiliki kondisi sehat yaitu bergerak aktif, bulu tidak rontok, kaki tidak bengkok atau cacat. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok meliputi kontrol, perlakuan I (dosis 50 mg/kg BB), perlakuan II (dosis 100 mg/kg BB) dan perlakuan III (dosis 200 mg/kg BB) dengan 6 ulangan pada masing-masing perlakuan. Jumlah sampel mencit yang digunakan adalah 24 ekor.

##### 3.3.2. Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) yaitu terdiri dari 4 kelompok dengan 6 ulangan pada setiap kelompok seperti pada tabel berikut ini :

Tabel 3 1. Kelompok Penelitian

Mencit Normal	Kontrol ( <i>Non-oral Treatment</i> Ekstrak Etanol Propolis)
	Dosis I ( <i>Oral treatment</i> dengan dosis 50 mg/kg BB)
	Dosis II ( <i>Oral treatment</i> dengan dosis 100 mg/kg BB)
	Dosis III ( <i>Oral treatment</i> dengan dosis 200 mg/kg BB)

### 3.4. Aklimasi Hewan Coba

Semua mencit perlakuan sebelum digunakan sebagai hewan coba, terlebih dahulu diadaptasikan (diaklimasikan) terhadap lingkungan selama  $\pm 1$  minggu untuk dikontrol kondisi kesehatannya. Hewan coba hanya diberi makan berupa pelet BR 1 dan minum air mineral secara *ad libitum* serta dibersihkan dan diganti sekam kandang setiap 3 hari sekali.

### 3.5. Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis (EEP)

Bahan mentah propolis didapatkan dari Peternakan Tawon Rimba Raya Jl. Dr. Wahidin 8 Lawang, Malang.

Propolis mentah ditimbang sebanyak 200 gr dimaserasi dengan etanol absolut sebanyak 1 L. Larutan hasil maserasi disaring dan dievaporasi dengan evaporator selama  $\pm 1,5-2$  jam. Hasil ekstraksi yang diperoleh kira-kira 1/10 dari bahan alam kering (10 gram ekstrak/100 gram sampel). Ekstrak yang dihasilkan disaring dan diuapkan dalam cawan yang dipanaskan di dalam oven. Hasil ekstraksi (*crude extract*) propolis yang diperoleh diambil dan diletakkan dalam botol dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4°C.

### 3.6. Penyiapan Ekstrak dan *Oral Treatment* pada Mencit Kelompok Perlakuan

Persiapan ekstrak yang akan ditimbang untuk masing-masing dosis tergantung dari berat rata-rata kelompok perlakuan. Total ekstrak yang ditimbang selanjutnya dilakukan pengenceran 1:10 dengan aquades. EEP yang di dapatkan bersifat sangat pekat sehingga untuk proses pelarutannya ditambahkan dengan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Selanjutnya, mencit kelompok *Oral Treatment* disonde dengan EEP sesuai dengan dosis pada masing-masing kelompok. Perlakuan sonde dilakukan selama 2 minggu.

### **3.7. Isolasi Organ Limfoid**

Isolasi organ limfoid yang dilakukan yaitu isolasi spleen. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu pertama kali mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, kemudian ditelentangkan pada papan bedah dimana seluruh *extrimitas*nya difiksasi dengan jarum pentul. Bagian ventral disemprot dengan alkohol 70%. Sebelum pembedahan, kondisi papan bedah, alat bedah, dan tangan harus disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Selanjutnya, dilakukan *sectio* untuk mengambil organ spleen.

### **3.8. Analisis Flowcytometry**

Spleen dicuci dalam Pbs steril sebanyak 2 kali. Spleen diletakkan pada cawan petri yang telah berisi Pbs steril, dipencet dengan menggunakan pangkal spuit (arah pemencetan searah dengan jarum jam yaitu dari atas ke bawah sebanyak 3-4 kali). Selanjutnya, spleen yang telah dihaluskan disaring dengan *wire* dan ditampung ke dalam propilen 15 ml. Suspensi dalam propilen ditambah dengan Pbs hingga 10 ml. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm pada suhu 4° C selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 1 ml Pbs steril.

Suspensi sebanyak 70µl dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* yang telah berisi 500 µl Pbs steril. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4° C selama 5 menit. Supernatan di buang dan pelet yang diperoleh di tambahkan dengan anti mouse CD4 FITC *conjugated*, anti mouse CD8 PE *conjugated* untuk pewarnaan ekstraseluler.

Pewarnaan intraseluler seperti analisis IFN- $\gamma$ , pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 100µl *cytofix*, inkubasi selama 20 menit pada kondisi gelap, selanjutnya diresuspensi dengan 1 ml *washperm*. Selanjutnya, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4° C selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet yang diperoleh ditambahkan dengan anti mouse IFN- $\gamma$ . Pelet yang sudah diberi antibodi, diresuspensi dengan 300µl Pbs, kemudian dipindahkan pada *cuvet*. Selanjutnya, dilakukan analisis secara

kuantitatif menggunakan nozzleBD Biosciences FACS Calibur™ *flowcytometer*.

### 3.9. Analisis Data

Data hasil *flowcytometry* di analisis dengan software BD Cell Quest Pro™. Data yang digunakan berupa data rasio/jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$ . Data tidak berdistribusi normal dan varians tidak sama /tidak homogen, walaupun dengan transformasi data, sehingga dilakukan analisis statistik nonparametrik. Data di uji dengan Kruskal Wallis dengan  $\alpha = 0,05$ . Uji lanjutan dengan Mann Whitney. Analisa data dilakukan menggunakan program SPSS 16.0 *for Windows*.



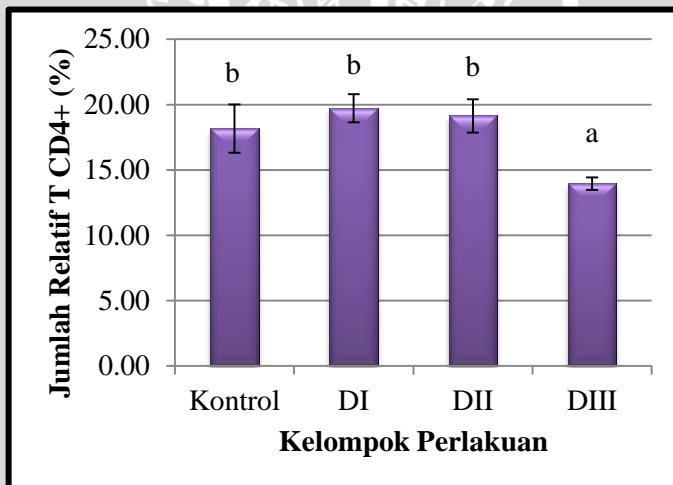
## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas immunomodulator EEP (Ekstrak Etanol Propolis) di analisis dari pemberian ekstrak tersebut dengan dosis 0 mg/kg BB (kontrol), 50 mg/kg BB (dosis I), 100 mg/kg BB (dosis II) dan 200 mg/kg BB (dosis III). Analisis dilakukan melalui perhitungan jumlah sel relatif. Jumlah sel relatif menunjukkan prosentase jumlah sel tersebut terhadap jumlah sel yang lain.

### 4.1. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup> dan T CD8<sup>+</sup>

#### 4.1.1. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>

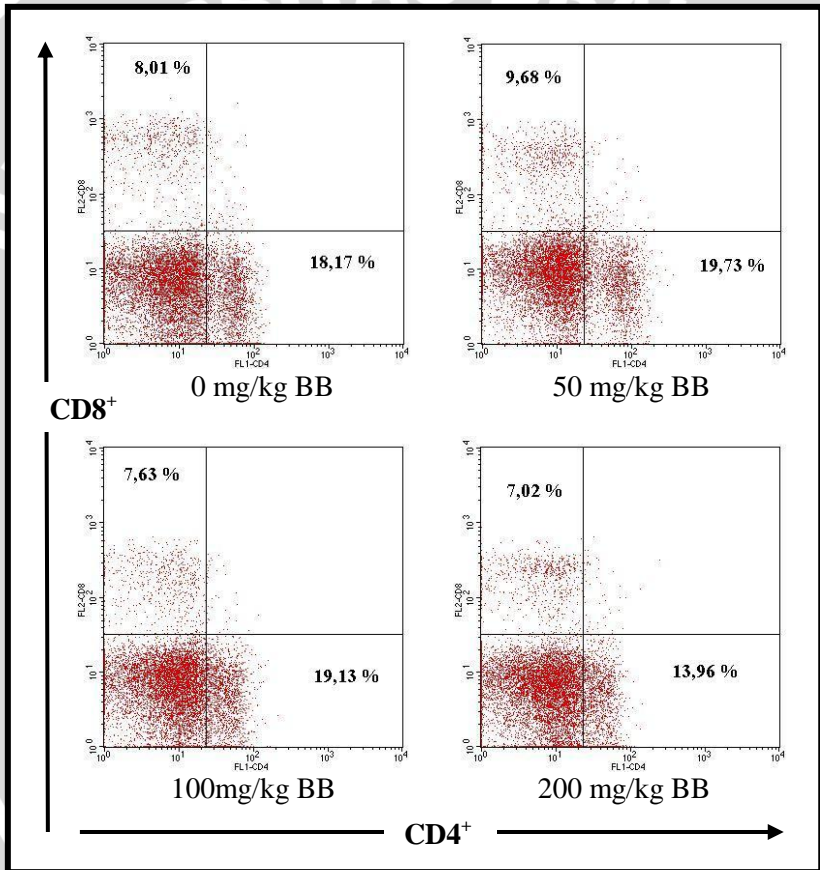
Berdasarkan hasil analisis *flowcytometry* (Gambar 4.1) dapat diketahui peningkatan atau penurunan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 4.1. Jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) (Kontrol = kontrol tanpa perlakuan, DI = dosis 50 mg/kg BB, DII = dosis 100 mg/kg BB, DIII = dosis 200 mg/kg BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann Whitney.

Pemberian EEP pada dosis I dan II terjadi peningkatan secara tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) masing-masing sebesar 19,73 % dan 19,13 % dibandingkan dengan kontrol sebesar 18,17 % (Gambar 4.2). Sedangkan pemberian ekstrak etanol propolis dosis III dapat menurunkan jumlah relatif sel TCD4<sup>+</sup> secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Pemberian EEP dosis III dapat menurunkan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi sebesar 13,96% dibandingkan dengan kontrol (Gambar 4.2).



Gambar 4.2. Persentase jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup>

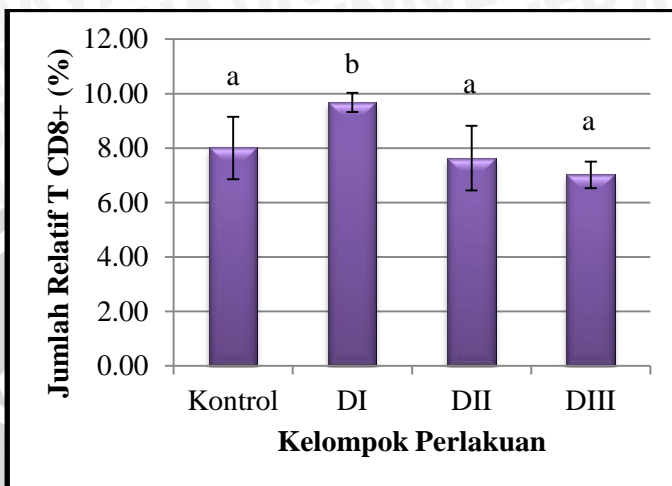


Peningkatan proliferasi sel T CD4<sup>+</sup> pasca pemberian EEP diduga akibat adanya senyawa CAPE pada propolis yang berfungsi sebagai imunostimulator. Menurut penelitian Park, dkk (2004), senyawa CAPE pada propolis mampu meningkatkan produksi sitokin IL-2. Sitokin IL-2 merupakan molekul mediator yang berperan terutama terhadap sistem imunitas adaptif. Sitokin ini sebagian besar diproduksi oleh sel Th 1, namun sebagian kecil diantaranya diproduksi oleh sel Tc. Sitokin IL-2 berfungsi sebagai faktor pertumbuhan bagi sel T yang dirangsang antigen dan berperan dalam ekspansi klon sel T setelah pengenalan dengan antigen (Baratawidjaya & Rengganis, 2010). Aktivitas sitokin IL-2 mampu menginisiasi proliferasi dan diferensiasi sel Th 1, sehingga dikenal dengan aktivitas *autocrine* (bekerja terhadap sel yang memproduksinya) (Wahab & Hussain, 2013). Hal inilah yang diduga penyebab terjadinya peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>. Keberadaan sel T CD4<sup>+</sup> di dalam tubuh diperlukan dalam induksi respon imun terhadap antigen asing (Baratawidjaya & Rengganis, 2010).

Penurunan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi pasca pemberian EEP diduga akibat adanya flavonoid pada propolis yang bekerja antagonis dan memberikan efek supresan terhadap aktivasi sel T CD4<sup>+</sup>. Menurut Nazir (2013), senyawa aktif pada tanaman dapat bersifat sebagai imunostimulator yaitu meningkatkan sistem imun maupun immunosupressor yaitu menekan sistem imun. Simplisia pada tanaman memiliki lebih dari satu senyawa aktif atau *multicompound*. Pada senyawa *multicompound* ada yang bekerja secara sinergis (saling menguatkan) atau justru bersifat antagonis. (Robinson, 1995). Menurut penelitian Ansorge, dkk, (2003) menunjukkan bahwa propolis mensupresi sintesis sel T, dimana mekanisme ini dimediasi oleh senyawa CAPE, quercetin dan hesperidin.

#### **4.1.2. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup>**

Hasil analisis jumlah sel T CD8<sup>+</sup> menggunakan *flowcitometry* menunjukkan adanya perubahan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> pada semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol (gambar 4.3). Perubahan tersebut diketahui dari adanya peningkatan dan penurunan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 4.3. Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup> (p<0,05). (Kontrol = kontrol tanpa perlakuan, DI = dosis 50 mg/kg BB, DII = dosis 100 mg/kg BB, DIII = dosis 200 mg/kg BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann Whitney.

Pemberian EEP menunjukkan pengaruh terhadap aktivasi sel T CD8<sup>+</sup>. Pemberian dosis I dapat meningkatkan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> yang teraktivasi secara signifikan (p<0,05). Jumlah sel T CD8<sup>+</sup> terjadi peningkatan secara signifikan sebesar 9,68%, dibandingkan kontrol sebesar 8,01 %. Berbeda halnya, dosis II dan III terjadi penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> secara tidak signifikan masing-masing sebesar 7,63 % dan 7,02 % (Gambar 4.2). Berdasarkan hasil tersebut dosis optimal untuk meningkatkan aktivasi sel T CD8<sup>+</sup> adalah dosis I. Hal ini dikarenakan pada dosis tersebut optimal untuk meningkatkan proliferasi sel T CD8<sup>+</sup>.

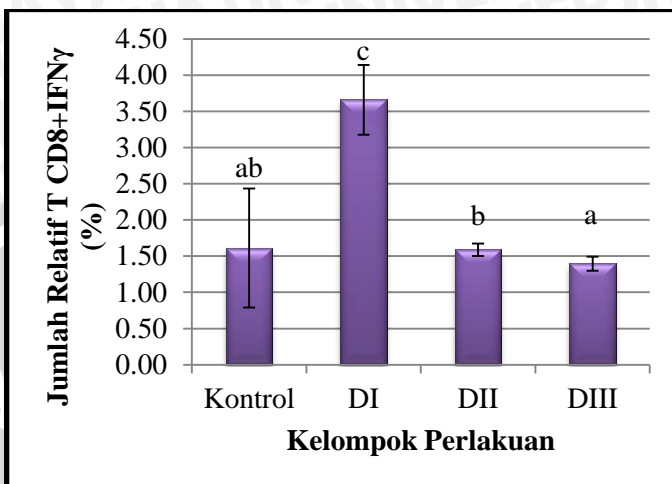
Peningkatan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> yang teraktivasi tidak terlepas dari pengaruh IL-2 yang di induksi senyawa CAPE pada propolis seperti yang dijelaskan sebelumnya. Sitokin IL-2 yang diproduksi oleh sel Th1 mampu menstimulasi sel Tc/ sel T sitotoksik (Nelson, 2004). Selain itu, proliferasi sel T CD8<sup>+</sup> juga dipengaruhi oleh sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi. Hal ini dikarenakan sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi akan berdiferensiasi menjadi Th 1 dan memproduksi

sitokin IL-2 (Baratawidjaya & Rengganis, 2010). Begitu juga dengan penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> yang disebabkan pasca pemberian dosis III dikarenakan dosis tersebut juga mengakibatkan penurunan sel T CD4<sup>+</sup>. Menurut Kumamoto, dkk, (2011) menyebutkan bahwa salah satu penyebab penurunan sel T CD8<sup>+</sup> adalah penurunan sel T CD4<sup>+</sup>. Hal ini dikarenakan sel T CD4<sup>+</sup> yang berdiferensiasi menjadi Th 1 memproduksi sitokin IL-2, dimana aktivitas sitokin ini selain bersifat *autocrine* (bekerja terhadap sel yang memproduksinya) juga *paracrine* (bekerja terhadap sel lain, seperti sel T CD8<sup>+</sup>) (Cruse & Lewis, 2010).

Aktivasi sel T CD8<sup>+</sup> akibat rangsangan sitokin IL-2 menyebabkan diferensiasi menjadi sel T *killer* yang berfungsi untuk mengeliminasi sel-sel yang terinfeksi antigen asing. Sel T CD8<sup>+</sup> mengenal peptida antigen asing dalam sel terinfeksi melalui kompleks dengan MHC kelas I pada APC. Sel Tc diaktifkan dan melepaskan isi granul yang berupa perforin (protein pembentuk pori pada membran sel target) dan granzim. Pori yang dibentuk perforin pada sel target memberikan jalan bagi granzim masuk ke dalam sel target, sehingga menyebabkan lisisnya sel target (Baratawidjaya & Rengganis, 2010).

#### **4.2. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$**

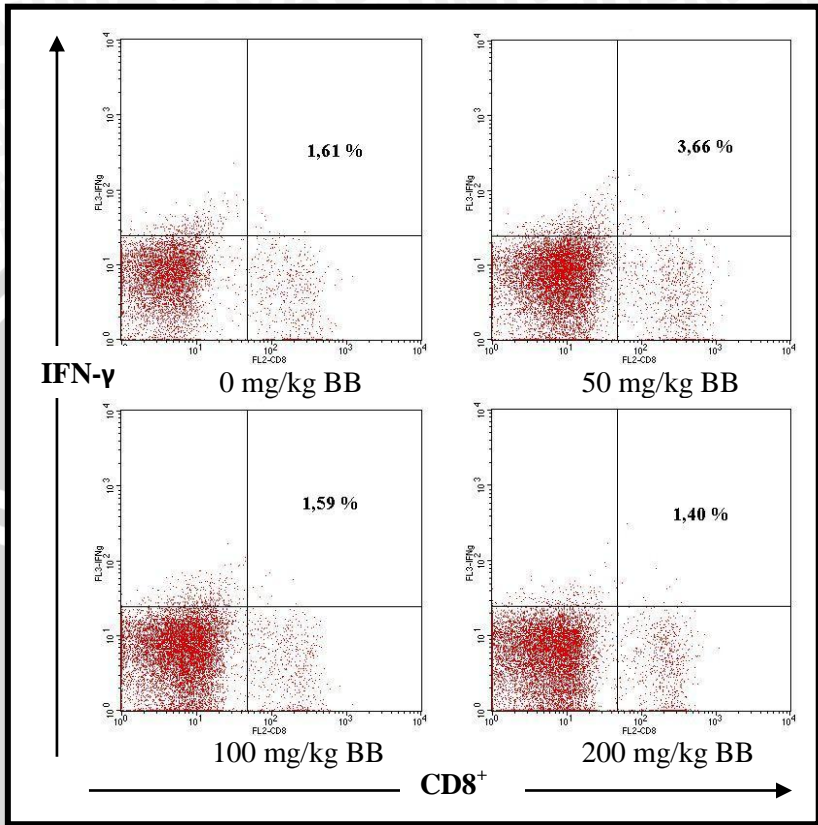
Berdasarkan hasil analisis *flowcytometry* (Gambar 4.4) dapat diketahui peningkatan atau penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> memproduksi sitokin IFN- $\gamma$  dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 4.4. Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ). (Kontrol = kontrol tanpa perlakuan, DI = dosis 50 mg/kg BB, DII = dosis 100 mg/kg BB, DIII = dosis 200 mg/kg BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann Whitney.

EEP dapat mempengaruhi perubahan produksi sitokin IFN $\gamma$  oleh sel TCD8<sup>+</sup>. Perubahan ini ditunjukkan dari peningkatan dan penurunan produksi sitokin IFN $\gamma$  oleh sel TCD8<sup>+</sup> dibandingkan dengan kontrol. Dosis I menunjukkan peningkatan produksi sitokin IFN $\gamma$  secara signifikan ( $p < 0,05$ ) sebesar 3,66 % dibandingkan dengan kontrol sebesar 1,61 %. Berbeda dengan dosis DII dan III terjadi penurunan produksi IFN $\gamma$  secara tidak signifikan masing-masing sebesar 1,59% dan 1,40% dibandingkan dengan kontrol (Gambar 4.5).



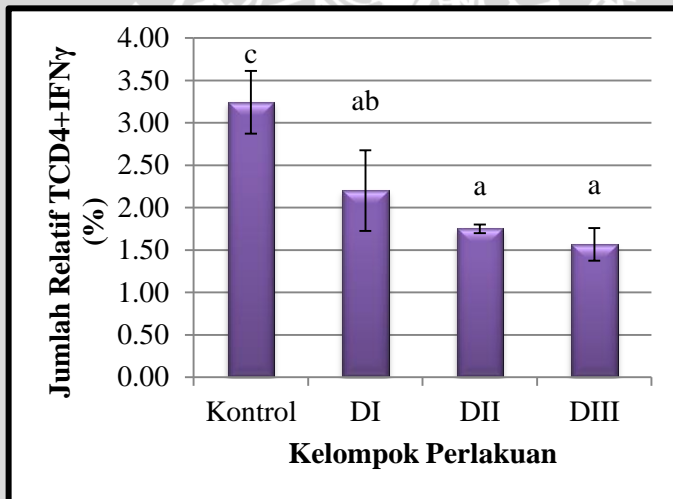
Gambar 4.5. Persentase jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$

Peningkatan sekresi sitokin IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh sel T CD8<sup>+</sup> pada dosis I, diduga di induksi oleh senyawa CAPE pada propolis. Hal ini didukung oleh penelitian Park, dkk (2004), pemberian senyawa CAPE mampu meningkatkan sekresi sitokin IFN- $\gamma$ . Sitokin IFN- $\gamma$  merupakan sitokin pro-inflamasi yang diproduksi berbagai sel sistem imun termasuk sel T CD8<sup>+</sup> yang berperan terutama dalam imunitas non spesifik dan spesifik seluler. Dalam imunitas non spesifik, sitokin ini merupakan sitokin utama MAC (*Macrophages Activating Cytokine*), sedangkan dalam

imunitas spesifik seluler berperan dalam meningkatkan aktivasi sel T CD4<sup>+</sup> dan T CD8<sup>+</sup> (Wahab & Hussain, 2013). Makrofag berfungsi sebagai pertahanan non spesifik yang menangkap dan mengeliminasi antigen asing melalui proses fagositosis dan selanjutnya mempresentasikannya ke sel T (Baratatawidjaya & Rengganis, 2010). Peningkatan sekresi sitokin IFN- $\gamma$  oleh sel T CD8<sup>+</sup> pada dosis I, dikarenakan dosis tersebut juga meningkatkan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup>. Demikian pula, penurunan sekresi sitokin IFN $\gamma$  oleh sel T CD8<sup>+</sup> pada dosis II dan III, dikarenakan kedua dosis tersebut juga menurunkan jumlah sel relatif T CD8<sup>+</sup>.

#### 4.3. Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$

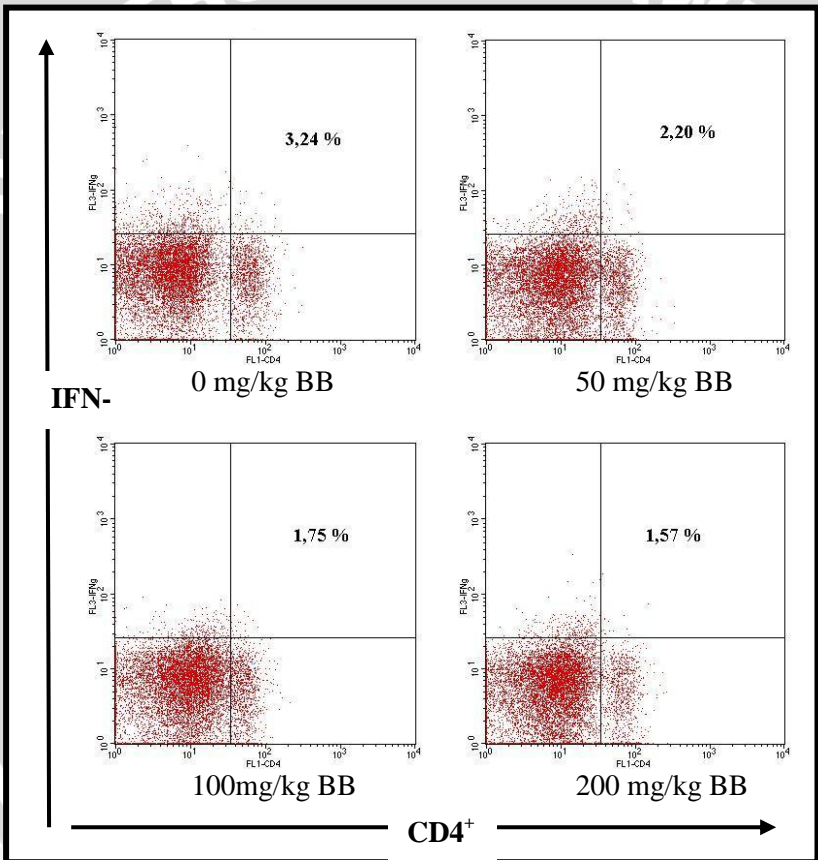
Hasil analisis *flowcytometry* (Gambar 4.6) dapat diketahui penurunan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$  dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 4.6. Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ). (Kontrol = kontrol tanpa perlakuan, DI = dosis 50 mg/kg BB, DII = dosis 100 mg/kg BB, DIII = dosis 200 mg/kg BB).

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Mann Whitney.

Pemberian EEP dengan dosis yang semakin meningkat berbanding terbalik dengan produksi sitokin IFN $\gamma$  oleh sel TCD4 $^+$ . Dosis I, II, dan II menurunkan produksi sitokin IFN $\gamma$  secara signifikan ( $p < 0,05$ ) masing-masing sebesar 2,20 % ; 1,75% dan 1,57% dibandingkan kontrol sebesar 3,24 %. Namun, antar perlakuan dosis tidak terdapat perbedaan signifikan (Gambar 4.7).



Gambar 4.7. Persentase jumlah relatif sel T CD4 $^+$  yang memproduksi sitokin IFN- $\gamma$ .

Sitokin IFN- $\gamma$  yang di sekresi sel T CD4<sup>+</sup> cenderung semakin menurun jumlahnya seiring dengan peningkatan dosis. Dosis I, penurunan sekresi IFN- $\gamma$  oleh sel T CD4<sup>+</sup> berbanding terbalik dengan peningkatan jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>. Demikian, pula penurunan sekresi IFN- $\gamma$  oleh sel T CD4<sup>+</sup> berbanding terbalik dengan peningkatan sekresi IFN- $\gamma$  oleh sel T CD8<sup>+</sup> dengan dosis yang sama. Dalam hal ini, diduga dosis berfungsi menjaga homeostasis atau keseimbangan jumlah sitokin IFN- $\gamma$  di dalam tubuh. Penurunan sekresi sitokin IFN- $\gamma$  oleh sel T CD4<sup>+</sup> pada dosis III, dikarenakan pada dosis tersebut juga menurunkan jumlah sel relatif T CD4<sup>+</sup>.

Sitokin IFN- $\gamma$  adalah sitokin pro-inflamasi, terutama diproduksi sel Th1 (Baratawidjaya & Rengganis, 2010). Keberadaan sitokin ini perlu dikontrol jumlahnya dengan tujuan untuk menjaga homeostasis atau keseimbangan sel-sel imunokompeten tubuh. Hal ini dikarenakan sitokin adalah molekul mediator yang memainkan peranan penting dalam meregulasi sel-sel limfosit, sehingga sel-sel tersebut dijaga jumlahnya untuk tetap seimbang. Ketidakseimbangan komponen-komponen sistem imun akan mengakibatkan berbagai penyakit (Santamaria, 2002).

Menurut penelitian Marquez, dkk, (2004), CAPE propolis mampu menghambat aktivitas NF $\kappa$ B, dimana aktivitas ini mengakibatkan penghambatan transkripsi gen IL-2. Protein NF $\kappa$ B adalah faktor transkripsi yang terdiri dari subunit p50 dan p65 saling berikatan (heterodimer). NF $\kappa$ B merangsang transkripsi berbagai macam gen, salah satunya gen IL-2. Pada keadaan nonaktif, NF $\kappa$ B terdapat di sitoplasma sebagai heterodimer yang berikatan dengan I $\kappa$ B (Inhibitor  $\kappa$ B). Adanya rangsangan dari luar mengakibatkan penambahan fosfat pada I $\kappa$ B, sehingga ikatan NF $\kappa$ B –I $\kappa$ B terlepas (Siebenlist, dkk, 1994). Selanjutnya, NF $\kappa$ B berpindah ke dalam inti dan berikatan dengan NF $\kappa$ B *binding domain* pada promotor gen yang menjadi sasaran aktivasi NF $\kappa$ B. Aktivitas biologik CAPE yaitu menghambat langsung ikatan p50-p65/ NF $\kappa$ B pada promotor gen target NF $\kappa$ B, sehingga NF $\kappa$ B tidak dapat berikatan dengan DNA target dan tidak terjadi proses transkripsi (Marquez dkk, 2004)



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Kesimpulan**

1. Pemberian ekstrak etanol propolis dosis 50 mg/kg BB dapat meningkatkan proliferasi sel T CD8<sup>+</sup> dan sekresi IFN- $\gamma$  oleh sel T CD8<sup>+</sup> secara signifikan dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Pada dosis yang sama, jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> juga meningkat namun tidak signifikan. Akan tetapi pada dosis ini, sekresi sitokin IFN- $\gamma$  oleh sel T CD4<sup>+</sup> terjadi penurunan secara signifikan. Berdasarkan hal tersebut, diduga ekstrak etanol propolis berperan dalam menjaga keseimbangan jumlah sitokin IFN- $\gamma$ . Dosis 200 mg/kg BB menyebabkan penurunan secara signifikan jumlah relatif T CD4<sup>+</sup> dan produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh T CD4<sup>+</sup>.
2. Dosis optimal untuk meningkatkan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> adalah 50 mg/kg BB.

#### **5.2. Saran**

1. Penelitian lanjut mengenai pengaruh ekstrak etanol propolis terhadap regulasi sitokin lain, sehingga diketahui sitokin apa yang dihasilkan dan berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel-sel imunokompeten.
2. Penelitian secara *in vitro*, sehingga dapat diketahui secara pasti pengaruh senyawa-senyawa pada ekstrak etanol propolis tanpa dipengaruhi aktivitas fisiologis lain yang terjadi di dalam tubuh.
3. Penelitian lanjut mengenai pengaruh waktu terhadap modulasi sel-sel sistem imun pasca pemberian ekstrak etanol propolis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K & Lichtman, A.H. 2005. **Cellular and Molecular Immunology Fifth Edition**. Elsevier Inc. USA.
- Bankova, V., Castro, S.L., & Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*.31:3–15.
- Baratawidjaja, K.G & Rengganis, Iris. 2010. **Imunologi Dasar Edisi Ke-9**. Balai Penerbit, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Burdock, G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*.36: 347–363.
- Challem J. 2004. **Tuberculosis, Medical Journals Document Value of Bee Propolis, Honey and Royal Jelly**. The Nutrition Reporter.
- Cruse, J.M & Lewis, R.E. 2010. **Atlas of Immunology, Second Edition**. CRC Press. United States.
- Fatahinia, M., Khosravi, A.R., & Shokri, H. 2012. **Propolis efficacy on TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 cytokine production in old mice with and without systemic candidiasis**. Elsevier Inc. USA.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M., Guimaraes, S. 2006. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*.13: 170–175.
- Gebara, E.C.E., Lima, L.A., & Mayer, M.P.A. 2002. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *J. Microbiol.* vol.33 no.4.
- Girgin, G., Baydar, T., Ledochowski, M., Schennach, H., Bolukbasi, D.N., Sorkun, K., Salih, B., Sahin, G & Fuchs, D. 2009. Immunomodulatory Effect of Turkish Propolis :Changes in neopterin Release and Tryptophan Degradation. *Immunobiology*. 214 (2):129-34.
- Hu, F., Hepburn, H.R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S.E., & Daya, S. 2005. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*.100 :276–283.
- Kiernan, J.A.1990. **Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice 2<sup>nd</sup> edition**. Pergamon. USA

- Krell, R. 1996. Value-Added Products From Beekeeping. Fao agricultural services bulletin no. 124. <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm>. Diakses pada tanggal 18 November 2013.
- Mahanani, R.A. Karim, & N. Nurjanah. 2011. **Keajaiban Propolis**. Pustaka Bunda. Jakarta.
- Marquez, Nieves., Sancho, Rocio., Macho, Antonio., Calzado, M.A., Fiebrich, B.L & Munoz, Eduardo. 2004. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits T-Cell Activation by Targeting Both Nuclear Factor of Activated T-Cells and NF- $\kappa$ B Transcription Factors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308 : 993-1001.
- Maulana, MS. 2010. Trigona : Lebah Penghasil Propolis. <http://www.agroindustriindonesia.blogspot.com/2010/10/trigona-lebah-penghasil-propolis.html>. Diakses tanggal 20 Januari 2014.
- Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M., Bankova, V., & Sforcin, J.M. 2002. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 79: 331–334.
- Missima, F., Pagliarone, A.C., Orsatti, C.L., & Sforcin, J.M. 2009. The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1: 11–15.
- Nazir, N. 2013. Immunomodulatory Activity of Isoflavones Isolated from *Iris Kashmiriana*: Effect on T-Lymphocyte Proliferation and Cytokine Production in Balb/C Mice. *Journal of Biomedicine & Preventive Nutrition*. 3:151–157. Elsevier Masson. Perancis.
- Nelson, Brad.H. 2004. IL-2, Regulatory T Cells and Tolerance. *J Immunol*. 172:3983-3988.
- Orsatti CL., Missima F., Pagliarone AC., & Sforcin JM. 2010. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J Ethnopharmacol*. 129: 314-318.
- Orsi, R.O., Sforcin, J.M., Funari, S.R., & Bankova, V. 2005. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. *International Immunopharmacology*. 5: 359–368.

- Park, J.H., J.K.Lee, H.S. Kim, S.T. Chung, J.H. Eom, K.A.Kim, S.J. Chung, S.U. Paik & H.Y. Oh. 2004. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Intl. Immunopharmacol.* 4: 429-436.
- Radiati, L.E. 2002. Penghambatan Enteropatogen oleh fraksi Diklorometan Jahe. *Habitat* Vol. XIII No 2. ISSN: 0853516.
- Rifa'I, Muhaimin., Kawamoto, Yoshiyuki, Nakashima, Izumi & Suzuki, Haruhiko. 2004. Essential Roles of CD8+CD122+ Regulatory T Cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine.* Vol 200.No 9.1123-1134
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. ITB. Bandung.
- Romagnani, S. 2006. Regulation of the T cell response. *Clinical and Experimental Allergy.* 36: 1357–1366.
- Santamaria, Pere. 2002. Cytokines and Chemokines in Autoimmune Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 520.
- Schinkel, C. 2003. The role of IFN-gamma in surgical patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 23: 341–349.
- Sforcin, J.M. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology.* 113 :1–14.
- Siebenlist U, Franzo G, & Brown K. 1994. Structure Regulation and Function of NF Kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:405–455
- Siregar, H.C.N., Asnanth M.F., & Yuke, O. 2011. **Propolis Madu Multikhasiat.** Penebar Swadaya. Jakarta.
- Suranto, A. J. 2007. **Dahsyatnya Propolis untuk Menggempur Penyakit.** PT Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Tazulakhova, E.B., Parshina O.V., Guseva T.S., & Ershorv F.I. 2001. Russian experience in screening, analysis, and clinical application of novel interferon inducers. *J Interferon Cytokine Res.* 21(2):65-73.
- Virella G. 2001. **Medical Immunology 5<sup>th</sup> edition revised and expanded.** Marcel Dekker USA.
- Wahab, Shadma & Hussain, Arshad. 2013. Cytokines As Targets For Immunomodulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol 5, Suppl 3.

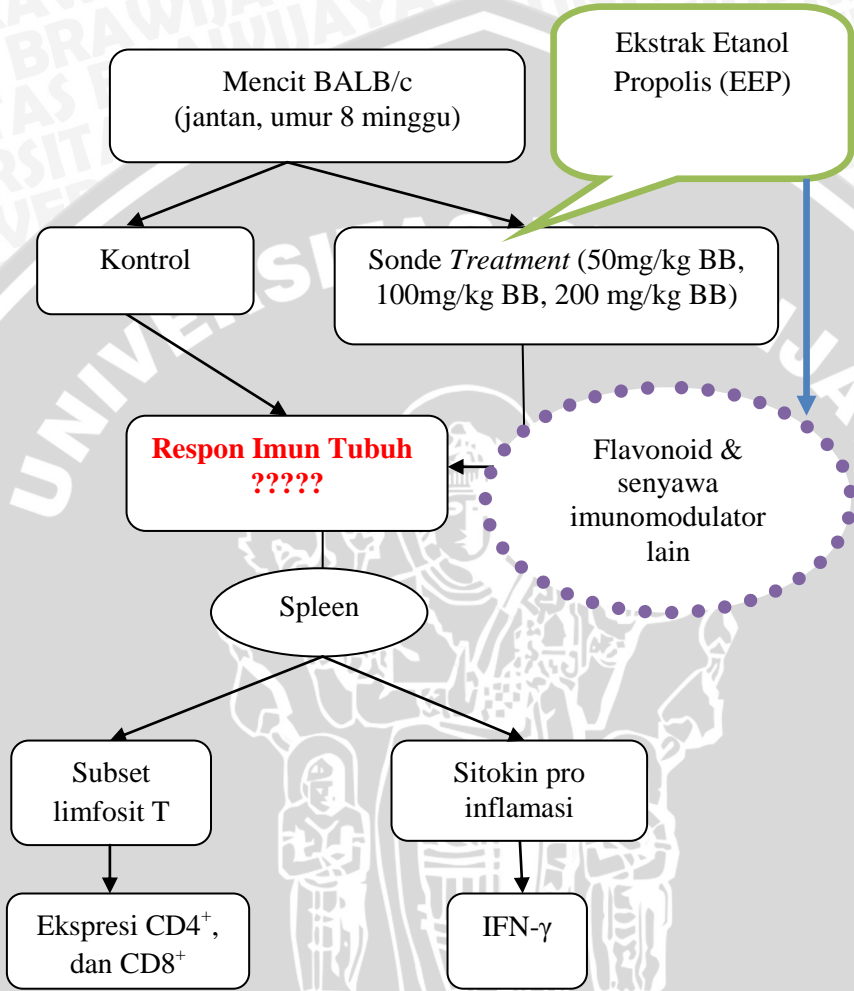
Welsh, Jennifer. 2012. <http://i.livescience.com/images/i/000/025/957/i02/Honey-Bees-propolis.jpg?1333146443>. Diakses tanggal 18 November 2013.

Wu, Jie., Xie, Aini & Chen, Wenchao. 2014. Review Article : Cytokine Regulation and Immune Tolerance. *Burn & Trauma*. Vol.2, No 1, pp 11-15.

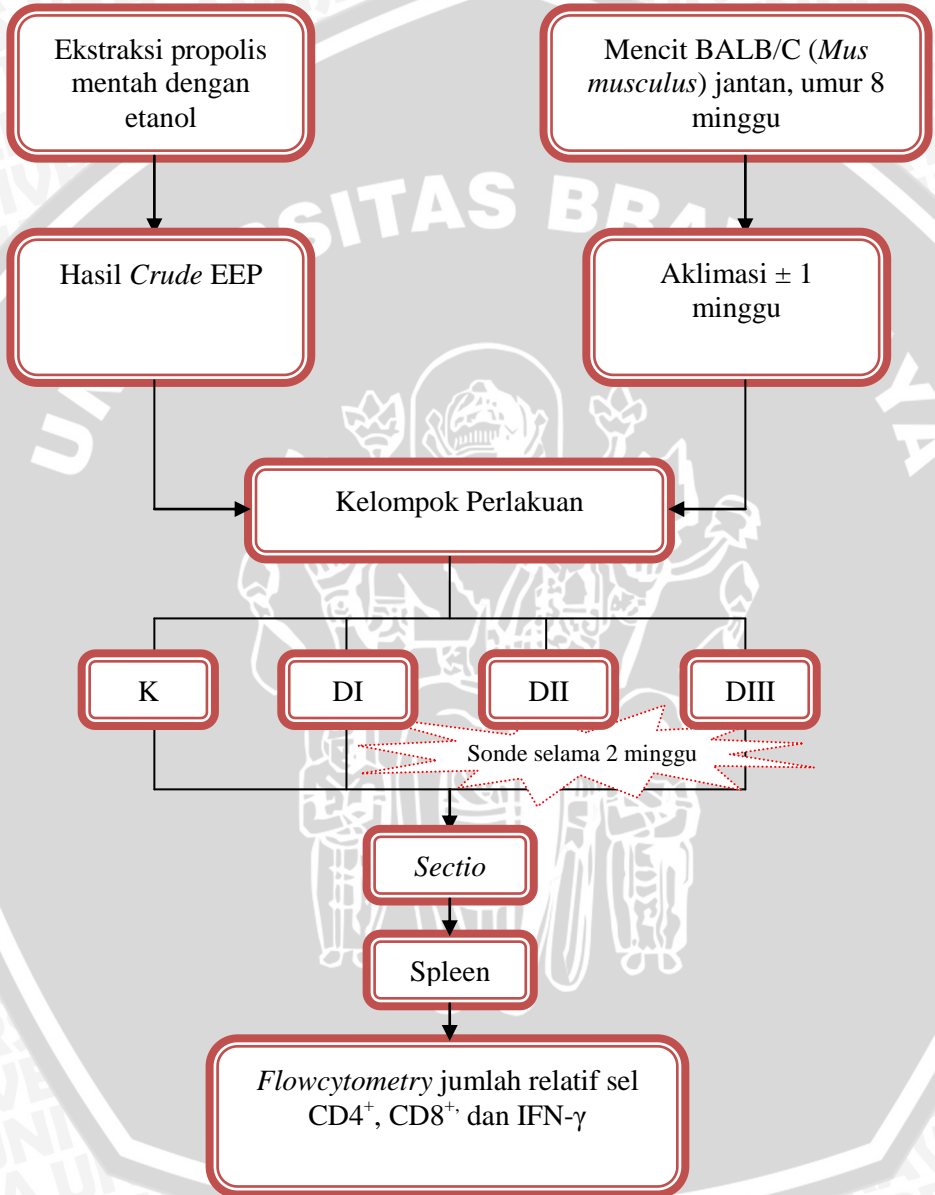
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# Lampiran 1. Kerangka Konsep Penelitian



## Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian



**Lampiran 3. Hasil analisis Kruskal Wallis, uji lanjut Mann Whitney jumlah relatif sel T CD4+**

Tabel LT 3.1. Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup>

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Jumlah_relative_CD4	Kontrol	6	12.83
	D1	6	18.00
	D2	6	15.67
	D3	6	3.50
	Total	24	

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Jumlah_relative_CD4
Chi-Square	14.567
df	3
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 3.1.1. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DI

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4	Kontrol	6	4.67	28.00
	D1	6	8.33	50.00
	Total	12		



**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD4
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-1.761
Asymp. Sig. (2-tailed)	.078
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 3.1.2. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4	Kontrol	6	5.67	34.00
	D2	6	7.33	44.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD4
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 3.1.3. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DIII

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4	Kontrol	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics <sup>b</sup>	
	Jumlah_relative_CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 3.1.4. Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4	D1	6	7.17	43.00
	D2	6	5.83	35.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD4
Mann-Whitney U	14.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 3.1.5. Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII

### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4	D1	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 3.1.6. Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4	D2	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

**Lampiran 4. Hasil analisis Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel T CD8+**

Tabel LT 4.1 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T CD8+

<b>Ranks</b>			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Jumlah_relative_CD8	Kontrol	6	12.75
	D1	6	20.42
	D2	6	9.67
	D3	6	7.17
	Total	24	

<b>Test Statistics<sup>a,b</sup></b>	
	Jumlah_relative_CD8
Chi-Square	11.910
Df	3
Asymp. Sig.	.008

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel 4.1.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol - DI

<b>Ranks</b>				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8	Kontrol	6	4.25	25.50
	D1	6	8.75	52.50
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8
Mann-Whitney U	4.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-2.166
Asymp. Sig. (2-tailed)	.030
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 4.1.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII

### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8	Kontrol	6	7.50	45.00
	D2	6	5.50	33.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 4.1.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8	Kontrol	6	8.00	48.00
	D3	6	5.00	30.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD8
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	30.000
Z	-1.441
Asymp. Sig. (2-tailed)	.150
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 4.1.4 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8	D1	6	9.17	55.00
	D2	6	3.83	23.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-2.562
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 4.1.5 Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII

Ranks			
Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8 D1	6	9.50	57.00
D3	6	3.50	21.00
Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan



Tabel LT 4.1.6 Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8	D2	6	7.33	44.00
	D3	6	5.67	34.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD8
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

**Lampiran 5. Hasil analisis Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$**

Tabel LT 5.1. Uji Kruskall Wallis jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> -IFN $\gamma$

<b>Ranks</b>			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Jumlah_relative_CD8IFNg	Kontrol	6	10.33
	D1	6	20.67
	D2	6	12.17
	D3	6	6.83
	Total	24	

<b>Test Statistics<sup>a,b</sup></b>	
	Jumlah_relative_CD8IFNg
Chi-Square	12.439
df	3
Asymp. Sig.	.006

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 5.1.1. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DI

<b>Ranks</b>				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8 IFNg	Kontrol	6	4.33	26.00
	D1	6	8.67	52.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8IFNg
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	26.000
Z	-2.082
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.041 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 5.1.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII

### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8 IFNg	Kontrol	6	6.50	39.00
	D2	6	6.50	39.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8IFNg
Mann-Whitney U	18.000
Wilcoxon W	39.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 5.1.3. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8 IFNg	Kontrol	6	6.50	39.00
	D3	6	6.50	39.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD8IFNg
Mann-Whitney U	18.000
Wilcoxon W	39.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 5.1.4. Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8 IFNg	D1	6	9.50	57.00
	D2	6	3.50	21.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8IFNg
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 5.1.5. Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII

### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8 IFNg	D1	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD8IFNg
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 5.1.6. Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD8 IFNg	D2	6	9.17	55.00
	D3	6	3.83	23.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD8IFNg
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-2.567
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

**Lampiran 6. Hasil analisis Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel T CD4+ yang memproduksi sitokin IFN $\gamma$**

Tabel LT 6.1 Uji Kruskall Wallis jumlah relatif sel T CD4<sup>+</sup> -IFN $\gamma$

<b>Ranks</b>			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Jumlah_relative_CD4 IFNg	Kontrol	6	21.00
	D1	6	14.33
	D2	6	9.33
	D3	6	5.33
	Total	24	

<b>Test Statistics<sup>a,b</sup></b>	
	Jumlah_relative_CD4IFNg
Chi-Square	16.447
Df	3
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 6.1.1. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DI

<b>Ranks</b>				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4 IFNg	Kontrol	6	9.00	54.00
	D1	6	4.00	24.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD4IFNg
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

a. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 6.1.2. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DII

### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4 IFNg	Kontrol	6	9.50	57.00
	D2	6	3.50	21.00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	Jumlah_relative_CD4IFNg
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan



Tabel LT 6.1.3. Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4 IFNg	Kontrol	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD4IFNg
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 6.1.4. Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4 IFNg	D1	6	8.50	51.00
	D2	6	4.50	27.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD4IFNg
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	27.000
Z	-1.925
Asymp. Sig. (2-tailed)	.054
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 6.1.5. Uji Mann Whitney antara kelompok DI-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4 IFNg	D1	6	8.83	53.00
	D3	6	4.17	25.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD4IFNg
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-2.242
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Tabel LT 6.1.6. Uji Mann Whitney antara kelompok DII-DIII

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah_relative_CD4	D2	6	8.33	50.00
IFNg	D3	6	4.67	28.00
	Total	12		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah_relative_CD4IFNg
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-1.764
Asymp. Sig. (2-tailed)	.078
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

