BIOAKTIVITAS EKSTRAK ETANOL PROPOLIS TERHADAP SEL LIMFOSIT $CD4^{+}CD25^{+}$ DAN B220 PADA MENCIT BALB/C

SKRIPSI

oleh :
AISYAH ZAHROH ADEN
105090100111040

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

BIOAKTIVITAS EKSTRAK ETANOL PROPOLIS TERHADAP SEL LIMFOSIT $CD4^{+}CD25^{+}$ DAN B220 PADA MENCIT BALB/C

SKRIPSI

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

oleh :
AISYAH ZAHROH ADEN
105090100111040

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

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

BIOAKTIVITAS EKSTRAK ETANOL PROPOLIS TERHADAP SEL LIMFOSIT $CD4^{+}CD25^{+}$ DAN B220 PADA MENCIT BALB/C

oleh:
AISYAH ZAHROH ADEN
105090100111040

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

Menyetujui
Pembimbing Skripsi

Muhaimin Rifa'i, S.Si., PhD., Med. Sc.
NIP. 19680626 199702 1 001

Mengetahui.
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., PhD.
NIP. 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Aisyah Zahroh Aden
NIM : 105090100111040
Jurusan : Biologi
Judul Skripsi : Bioaktivitas Ekstrak Etanol Propolis terhadap Sel Limfosit $CD4^{+}CD25^{+}$ dan B220 pada 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. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-mata hanya digunakan sebagai acuan/ referensi.**
2. **Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.**

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,30 Juni 2014
Yang menyatakan,

Aisyah Zahroh Aden
NIM. 105090100111040

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang dibuat dan disusun oleh penulis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum sebagai bahan sumber referensi dan pembelajaran lanjutan, dengan ketentuan bahwa hak cipta berada pada penulis. Daftar pustaka yang tercantum dalam skripsi ini diperkenankan untuk dicatat, akan tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan atas seijin penulis dan harus diikuti dengan kebiasaan penulisan ilmiah dalam proses menyebutkannya.

Bioaktivitas Ekstrak Etanol Propolis terhadap Sel Limfosit $CD4^+CD25^+$ dan B220 pada Mencit Balb/C

Aisyah Zahroh Aden[1], Muhaimin Rifa'i[1]
[1]Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya
2014

ABSTRAK

Imunomodulator merupakan salah satu mekanisme untuk memodulasi kesetimbangan sistem imun tubuh. Propolis mengandung berbagai zat aktif dan diketahui dapat bermanfaat sebagai imunomodulator. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bioaktivitas ekstrak etanol propolis terhadap perubahan kwantitas sel T $CD4^+CD25^+$ dan sel B220 serta mengetahui dosis optimal ekstarak etanol propolis untuk meningkatkan sel-sel limfosit T $CD4^+CD25^+$ dan B220 pada mencit Balb/c. Mencit jantan Balb/c sehat berumur 8 minggu diaklimatisasi selama 1 minggu dan dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, yaitu: perlakuan kontrol, treatmen ekstrak etanol propolis dengan dosis 50 mg/kg BB, dosis 100 mg/kg BB, dan dosis 200 mg/kg BB. Seluruh mencit dibedah setelah dua minggu perlakuan. Sel limfosit diisolasi dari organ *spleen* dan profil sel yang mengekspresikan sel T $CD4^+CD25^+$ dan sel B220 diobservasi dengan analisis flowcytometri menggunakan software CellQuest. Data jumlah relatif sel dianalisis dengan uji statistik non parametrik berupa uji Kruskall Wallis dan Mann Whitney dengan $P < 0,05$ menggunakan program SPSS 16.0 *for* Windows. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak etanol propolis pada ketiga dosis mampu berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan jumlah sel T $CD4^+CD25^+$ dalam populasi sel T $CD4^+$. Pemberian dosis 100 dan 200 mg/kg BB akan tetapi berpangaruh secara signifikan terhadap penurunan jumlah sel T $CD4^+CD25^+$ dalam populasi sel limfosit.

Jumlah relatif sel B220 mengalami peningkatan akibat pemberian dosis 50 dan 200 mg/kg BB dan penurunan pada pemberian dosis 100 mg/kg BB, secara signifikan. Pemberian ekstrak etanol propolis pada dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB dengan demikian berpengaruh secara signifikan terhadap perubahan kwantitas sel T $CD4^{+}25^{+}$ dan B220 dengan dosis 50 mg/kg BB sebagai dosis optimal untuk meningkatkan sel $CD4^{+}CD25^{+}$ dan sel B B220 pada mencit Balb/c.

Kata kunci: B220, $CD4^{+}CD25^{+}$, dosis, kwantitas, propolis.

Bioactivity of Propolis Ethanolic Extract in Balb/C Mice's $CD4^+CD25^+$ and B220 Lhymposhyt Cell

Aisyah Zahroh Aden[1], Muhaimin Rifa'i[1]
[1]Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University
2014

ABSTRACT

Immunomodulator is one of mechanism to modulate the body's immune system balance. Propolis contains a variety of active substances and are known to be useful as an immunomodulator. This study was conducted to determine the bioactivity of propolis ethanolic extract against changes in the quantity of $CD4^+CD25^+$ T cells and B220 cells and determine the optimal dose of propolis ethanolic extract to improve lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ and B220 in Balb/c mice. Male mice Balb/c 8 weeks old healthy acclimatized for 1 week and were divided into four treatment groups, namely: control treatment, treatments of propolis ethanolic extract at a dose of 50 mg/kg, a dose of 100 mg/kg, and a dose of 200 mg/kg body weight. All of mice in every group was dissected after two weeks of treatment. Lymphocytes isolated from the spleen organ and profiles of cells expressing $CD4^+CD25^+$ T cells and B220 cells were observed with flowcytometri analysis using CellQuest software. Relative number data of cells was analyzed with a nonparametric statistical test: Kruskall Wallis and Mann Whitney test with $P < 0.05$ using SPSS 16.0 for Windows. The results showed that the treatment of propolis ethanolic extract on all three doses capable of significant influence on the increase in the number of $CD4^+CD25^+$ T cells in the $CD4^+$ T cell population. Dosing of 100 and 200 mg/kg can significantly influential to the decrease in the number of $CD4^+CD25^+$ T cells in the cell population of lymphocytes. The relative amount of

B220 cells increases due to dosing 50 and 200 mg/kg body weight and decrease in the dose of 100 mg/kg significantly. Giving propolis ethanolic extract at a dose of 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 200 mg/kg body weight thus significantly influence changes in the quantity of $CD4^{+}CD25^{+}$ T cells and B220 cells with a dose of 50 mg/kg as the optimal dose to increase the $CD4^{+}CD25^{+}$ T cells and B220 B cells in Balb/c mice.

Keywords: B220, $CD4^{+}CD25^{+}$, dose,propolis, quantity

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan atas kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah serta bimbingan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Bioaktivitas Ekstrak Etanol Propolis terhadap Sel Limfosit $CD4^{+}CD25^{+}$ dan B220 pada Mencit Balb/C". Shalawat serta salam tetap tercurahkan pada Nabi Muhammad SAW beserta para umatnya atas naungan harapan syafaat di hari akhir nanti. Penulisan skripsi ini ditujukan untuk memenuhi persyaratan dalam memperoleh gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik berkat bantuan berbagai pihak yang sangat memberikan dorongan semangat yang besar bagi penulis, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW yang telah melimpahkan rahmat dan karunia Islam.
2. Bapak Muhaimin Rifa'i, S.Si., PhD., Med.Sc selaku pembimbing atas bimbingan dan nasehat yang selalu mendampingi dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Bapak Dr.Ir.Moch.Sasmito Djati., MSi dan Bapak Drs. Aris Soewondo.,MSi selaku dosen penguji I dan II.
4. Bapak Imam, Ibu Listiyaningsih, Mas Fadhil, Mas Iqbal, Dik Naura, Dik Leli, Mas Irawan dan keluarga besar di Malang dan Purbalingga atas doa, cinta, dorongan semangat moril dan materil yang tak henti-hentinya diberikan secara ikhlas pada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Sahabat-sahabat seperjuangan: Yonna, Lia, Dwi, Prita, Riza, Emi, Tiara, Novi dan seluruh teman seperjuangan Biologi angkatan 2010 atas doa, bantuan, dan dukungannya.
6. Rekan-rekan Laboratorium Anfishew Biologi: Pak Harmadji, Mbak Dewi, Mas Bambang, Mbak Ririn, Mbak Dini, Indri, Warda, Qonita, Yuyun dan Arif atas doa, bantuan dan dukungannya.

7. Semua pihak yang telah mendukung terselesaikannya penulisan skripsi ini.

Demikian penulisan skripsi ini, semoga isi dari skripsi ini dapat memberikan informasi dan manfaat bagi semua pihak. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun dari semua pihak sangat penulis butuhkan untuk penyempurnaan di masa mendatang.

Malang, 30 Juni 2014

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....v
ABSTRACT vii
KATA PENGANTAR.....ix
DAFTAR ISI.....xi
DAFTAR TABEL..... xiii
DAFTAR GAMBAR.....xv
DAFTAR LAMPIRAN.....xvi
DAFTAR SINGKATAN..... xvii

BAB 1 PENDAHULUAN.....1
1.1.Latar Belakang.....1
1.2.Rumusan Masalah.....3
1.3.Tujuan.....3
1.4.Manfaat.....3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....4
2.1.Imunitas.....4
2.2.Spleen.....4
2.3.Limfosit dan Perkembangan Sel Limfosit.....6
2.4.Perkembangan dan Aktivasi Sel B.....7
2.5.Perkembangan dan Aktivasi Sel T $CD4^{+}CD25^{+}$.....8
2.6.Gambaran Umum Propolis.....10
2.6.1.Kandungan Kimia dan Manfaat Propolis.....13
2.7.Flowcytometri.....14

BAB III METODE.....16
3.1.Jenis Penelitian.....16
3.2.Waktu dan Tempat Penelitian.....16
3.3.Prosedur Kerja Penelitian.....16
3.3.1.Deskripsi Hewan Coba.....16
3.3.2.Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan.....17
3.3.3.Ekstraksi Propolis dengan Metode Maserasi.....17
3.3.4.Pemberian Ekstrak Etanol Propolis pada Hewan Coba secara Oral.....17
3.3.5.Dislokasi Hewan Coba dan Pengambilan Organ Spleen.....18

3.3.6.Analisis Flowcytometri 18
3.4.Analisa Data 19

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 20
4.1. Jumlah Relatif Sel $CD4^{+}CD25^{+}$ terhadap Populasi Sel $CD4^{+}$ 20
4.2. Jumlah Relatif Sel CD4+CD25+ terhadap Populasi Sel Limfosit 23
4.3. Jumlah Relatif Sel B220 26

BAB V PENUTUP 30
5.1. Kesimpulan 30
5.2. Saran 30

DAFTAR PUSTAKA 31
LAMPIRAN 36

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kelompok Perlakuan 17
Tabel LT 4.1 Hasil uji normalitas jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$ 39
Tabel LT 4.2 Hasil uji homogenitas jumlah relatif sel T $CD4^+$ $CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$ 39
Tabel LT 4.3 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T $CD4^+$ $CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$ 40
Tabel LT 4.3.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D1 40
Tabel LT 4.3.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D2 41
Tabel LT 4.3.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D3 42
Tabel LT 4.3.4 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D2 43
Tabel LT 4.3.5 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D3 44
Tabel LT 4.3.6 Uji Mann Whitney antara kelompok D2-D3 45
Tabel LT 5.1 Hasil uji normalitas jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ terhadap sel limfosit 47
Tabel LT 5.2 Hasil uji homogenitas jumlah relatif sel T $CD4^+$ $CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit 47
Tabel LT 5.3 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T $CD4^+$ $CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit 48
Tabel LT 5.3.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D1 49
Tabel LT 5.3.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D2 50
Tabel LT 5.3.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D3 51
Tabel LT 5.3.4 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D2 52
Tabel LT 5.3.5 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D3 53

Tabel LT 5.3.6 Uji Mann Whitney antara kelompok D2-D3 54
Tabel LT 6.1 Hasil uji normalitas jumlah relatif sel B220 55
Tabel LT 6.2 Hasil uji homogenitas jumlah relatif B220 55
Tabel LT 6.3 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel B220 56
Tabel LT 6.3.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D1 57
Tabel LT 6.3.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D2 58
Tabel LT 6.3.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D3 59
Tabel LT 6.3.4 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D2 60
Tabel LT 6.3.5 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D3 61
Tabel LT 6.3.6 Uji Mann Whitney antara kelompok D2-D3 62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur organ *spleen* 5
Gambar 2. Proses pembentukan sel limfosit dalam tubuh.....7
Gambar 3. *Trigona* sp. jenis lebah penghasil propolis dan madu 11
Gambar 4. Letak propolis pada sarang lebah 12
Gambar 5. Proses pengukuran sel darah berdasarkan fluorosensi 15
Gambar 6. Profil persentase jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$ hasil analisa flowcytometri pada setiap perlakuan (K= Kontrol, D1= Dosis 50 mg/kg BB, D2= Dosis 100 mg/kg BB, dan D3= Dosis 200 mg/kg BB).....21
Gambar 7. Jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$ antar kelompok perlakuan mencit setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol propolis selama 2 minggu secara oral.....22
Gambar 8. Profil persentase jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit hasil analisa flowcytometri pada setiap perlakuan (K= Kontrol, D1= Dosis 50 mg/kg BB, D2= Dosis 100 mg/kg BB, dan D3= Dosis 200 mg/kg BB).....23
Gambar 9. Jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit antar kelompok perlakuan mencit setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol propolis selama 2 minggu secara oral.....24
Gambar 10. Profil persentase jumlah relatif sel B220 hasil analisa flowcytometri pada setiap perlakuan (K= Kontrol, D1= Dosis 50 mg/kg BB, D2= Dosis 100 mg/kg BB, dan D3= Dosis 200 mg/kg BB).....27
Gambar 11. Jumlah relatif sel B220 antar kelompok perlakuan mencit setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol propolis selama 2 minggu secara oral 28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Konsep Penelitian.....36
Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian.....37
Lampiran 3. Jadwal Penelitian 38
Lampiran 4. Hasil analisis ragam, Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$.....39
Lampiran 5. Hasil analisis ragam, Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ terhadap sel limfosit 47
Lampiran 6. Hasil analisis ragam, Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel B220.....55

DAFTAR SINGKATAN

1. APC : *Antigen Presenting Cell*
2. CAPE : *Cafeic Acid Phenethyl Esther*
3. CD : *Cluster of Differentiation*
4. IFNγ : Interferon gamma
5. IL-1 : Interleukin-1
6. IL-2 : Interleukin-2
7. IL-4 : Interleukin-4
8. IL-5 : Interleukin-5
9. IL-6 : Interleukin-6
10. IL-10 : Interleukin-10
11. IL-12 : Interleukin-12
12. IL-17 : Interleukin-17
13. MHC : *Major Histocompatibility Complex Stimulating Factor*
14. NFAT : *Nuclear Factor of Activated T-cells*
15. NF-Kb : *Nuclear Factor Kappa b*
16. NK : *Natural Killer*
17. NKT : *Natural Killer T*
18. Treg : T regulator
19. TCR : *T Cell Antigen Receptor*
20. Th : *T helper*
21. TLR : *Toll Like Receptor*
22. TNF-α : *Tumor Necrosis Factor* alpha

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan sumber daya alam melimpah. Masyarakat Indonesia telah mengeksplorasi berbagai kekayaan alam tersebut untuk dimanfaatkan dalam memenuhi berbagai kebutuhan hidup mereka. Pemanfaatan sumber daya alam tersebut meliputi pemanfaatan untuk kepentingan dibidang kesehatan, perekonomian, hingga kepentingan sosial budaya masyarakat.

Salah satu produk sumber daya alam yang dapat ditemukan di Indonesia yaitu berupa produk propolis. Propolis merupakan produk alam yang berasal dari campuran produk turunan yang dihasilkan tumbuhan dan kemudian dimodifikasi serta digunakan lebah untuk berbagai kebutuhan. Lebah di alam menggunakan propolis sebagai bahan antibiotik dan pelindung dari adanya ancaman kekeringan bagi sarang mereka (Fatahinia, dkk., 2012).

Propolis mengandung bahan resin, asam lemak, lilin, protein, polisakarida, hidrokarbon, dan berbagai senyawa organik lainnya (Jaya, dkk., 2005 dan Lopes, dkk., 2014). Kombinasi berbagai zat tersebut menjadikan propolis banyak dimanfaatkan sebagai salah satu jenis obat tradisional yang banyak digunakan dan dimanfaatkan oleh masyarakat. Propolis sebagai obat tradisional dimanfaatkan sebagai obat anti-inflamasi, antibakterial, antiparasit, antifungi, antitumor, antioksidan, dan memiliki efek imunomodulator (Fatahinia, dkk., 2012).

Imunomodulator merupakan salah satu mekanisme yang dibutuhkan dalam sistem imun tubuh. Aktivitas imunomodulator merupakan suatu bentuk efek biologikal atau farmakogikal pada berbagai faktor yang berperan dalam respon imun. Respon imun yang timbul merupakan hasil adanya interaksi berbagai macam tipe sel yang berperan dalam sistem imun tubuh. Tujuan dari imunomodulator itu sendiri yaitu untuk memodulasi kesetimbangan (homeostasis) sistem imun. Aktivitas imunomodulator juga dapat digunakan untuk

mengobati dan mencegah berbagai jenis penyakit yang bersumber dari adanya ketidaksetimbangan yang terjadi. Bentuk dari imunomodulator dapat berupa imunostimultan dan imunosupresan (Nazir, 2014).

Upaya untuk menjaga homeostasis sistem imun tubuh dan pengobatan berbagai macam jenis penyakit yang berkaitan dengan sistem imun tubuh pada umumnya dilakukan dengan penggunaan obat-obatan imunomodulator yang bersifat sintesis. Penggunaan obat-obatan sintesis tersebut akan tetapi diketahui memiliki beberapa efek samping negatif. Beberapa efek samping tersebut yaitu timbulnya hipertensi, gagal ginjal, onkogenisitas, hipertrikosis, myelosupresi, dan anemia. Selain itu penggunaan obat-obatan imunomodulator sintesis juga masih tergolong mahal. Oleh karena itu penggunaan obat-obatan herbal yang berasal dari tanaman obat dan berbagai produk alam merupakan suatu upaya yang memungkinkan untuk dilakukan. Hal tersebut didasarkan pada terapi pengobatan untuk memodulasi sistem imun tubuh melalui aktivitas imunomodulator (Nazir, 2014).

Efek imunomodulator propolis diketahui lebih baik jika dibandingkan dengan bahan imunomodulator lainnya yang hanya memiliki komponen flavonoid sebagai kandungan zat utamanya (Mustafiah, dkk., 2011). Sejumlah penelitian klinis telah berhasil membuktikan bahwa propolis memiliki kemampuan dalam mengaktivasi sistem imun pada tubuh mencit maupun manusia yang diberi treatmen propolis. Hal tersebut didukung dengan data penelitian yang menunjukkan adanya peningkatan sekresi IL1 (Orsolic dalam Fatahinia, dkk., 2012) , IL2, IL4, peningkatan respon antibodi (Park, dkk. dalam Fatahinia, dkk., 2012), ploriferasi sel limfosit T, peningkatan rasio CD^+/CD^+ , dan aktivasi makrofag (Ivanovska dkk. dalam Fatahinia, dkk., 2012). Akan tetapi belum diketahui pengaruh propolis terhadap proses diferensiasi sel T CD4 (Okamoto, dkk., 2014). Aktivasi sel T CD4 diketahui juga akan berpengaruh pada proses ploriferasi sel B (Daniel, 2006). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bioaktivitas ekstrak etanol propolis terhadap produksi sel T $CD4^+CD25^+$ dan sel B B220 pada organ *spleen* mencit Balb/c.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis secara oral terhadap perubahan kwantitas sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dan sel B B220 pada organ *spleen* mencit Balb/c?
2. Berapakah dosis ekstrak etanol propolis yang optimal untuk meningkatkan sel-sel limfosit pada mencit Balb/c berdasarkan perubahan kwantitas sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dan sel B B220?

1.3. Tujuan

1. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol propolis terhadap perubahan kwantitas sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dan sel B B220 pada organ *spleen* mencit Balb/c.
2. Mengetahui dosis optimal ekstrak etanol propolis untuk meningkatkan sel-sel limfosit pada mencit Balb/c berdasarkan perubahan kwantitas sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dan sel B B220.

1.4. Manfaat

1. Aktivitas ekstrak etanol propolis terhadap perubahan kwantitas sel-sel limfosit pada mencit Balb/c yang telah diketahui diharapkan dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk pengujian ekstrak etanol propolis dalam penelitian klinis selanjutnya.
2. Diversifikasi bahan alami bagi pengobatan berbagai penyakit yang berhubungan dengan aktivitas imunomodulator diharapkan dapat diwujudkan sehingga penggunaan obat-obatan sintetis yang terkadang memiliki efek samping dapat dikurangi.
3. Pemanfaatan propolis sebagai obat dapat ditingkatkan sehingga produksinya di Indonesia dan nilai jualnyapun dapat lebih meningkat.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Imunitas

Pertahanan tubuh terhadap serangan patogen atau bahan-bahan berbahaya dari lingkungan luar, ditunjang oleh keberadaan sistem imun tubuh. Imunitas merupakan suatu bentuk pertahanan terhadap infeksi suatu penyakit yang terjadi dalam tubuh (Baratawidjaja & Iris, 2010). Sistem imun yang menjalankan fungsi imunitas terdiri atas sistem yang dibentuk oleh kerja molekul seperti protein, sel, jaringan, dan organ. Komponen-komponen tersebut akan bekerjasama dalam membentuk pertahanan terhadap serangan tubuh dari benda asing seperti kuman, parasit, racun, dll. Aktivitas pertahanan tubuh terhadap adanya infeksi dilakukan melalui serangkaian tahapan yang disebut sebagai respon imun (Nazir, 2014).

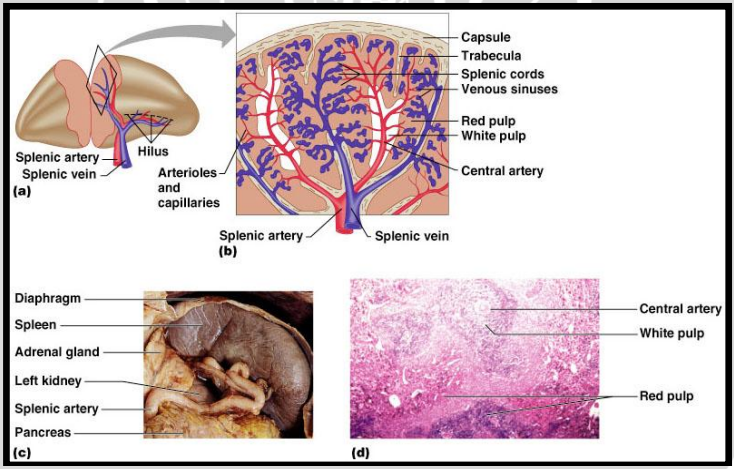
Kestabilan kesehatan tubuh merupakan hasil dari mekanisme imunoregulator atau imunomodulator yang melibatkan kerja imunitas selular dan humoral. Ketidakseimbangan faktor-faktor penunjang imunitas dapat berdampak pada timbulnya kondisi yang bersifat patologik bagi tubuh. Oleh karena itu dibutuhkan mekanisme imunomodulator yang dapat diwujudkan melalui aktivitas imunostimultan dan imunosupresan (Nazir, 2014). Imunostimultan merupakan kemampuan imunomodulator untuk meningkatkan kerja suatu sistem imun sedangkan imunosupresan memiliki aktivitas yang berlawanan, yakni bekerja dalam menekan sistem imun tertentu (Sasmito, dkk., 2007).

2.2. Spleen

Organ limfoid secara umum dibedakan atas organ limfoid primer dan organ limfoid sekunder. Bagian yang menyusun organ limfoid primer adalah timus dan sum-sum tulang belakang. Fungsi organ limfoid primer secara umum yaitu sebagai tempat untuk proses diferensiasi, pematangan, dan poliferasi dari sel T dan sel B (Baratawidjaja & Iris,

2010). Sel-sel limfosit yang telah dibentuk dan dimatangkan pada organ limfoid primer selanjutnya akan dikirim menuju organ limfoid sekunder malalui sistem peredaran darah. Organ limfoid sekunder merupakan organ limfoid peripheral berisi sel-sel imunokompeten yang dapat menangkap antigen (Rifa'i, 2011).

Organ limfa (*spleen*) merupakan salah satu organ limfoid sekunder yang terorganisir sangat tinggi. Berbagai mikroba yang masuk dalam tubuh dan telah diopsonisasi (diikat antibodi) akan difagosit terutama terjadi dalam *spleen* (Baratawidjaja & Iris, 2010). Fungsi *spleen* secara umum yaitu mengumpulkan dan menghancurkan sel darah merah non fungsional serta mengumpulkan berbagai antigen yang berasal dari aliran darah. Letak *spleen* ada di bagian sebelah kiri tubuh tepatnya di belakang lambung. Organ *spleen* terdiri atas daerah pulpa merah (daerah terbesar penyusun *spleen*) dan pulpa putih (Gambar 1). Proses penghancuran sel darah merah yang telah kehilanagan fungsinya terjadi di derah pulpa merah. Daerah pulpa putih merupakan tempat berkumpulnya sel B yang berasal dari pembuluh arteri di sekitar *spleen* (Rifa'i, 2011).



Gambar 1. Struktur organ spleen (Rifa'i, 2011)

2.3. Limfosit dan Perkembangan Sel Limfosit

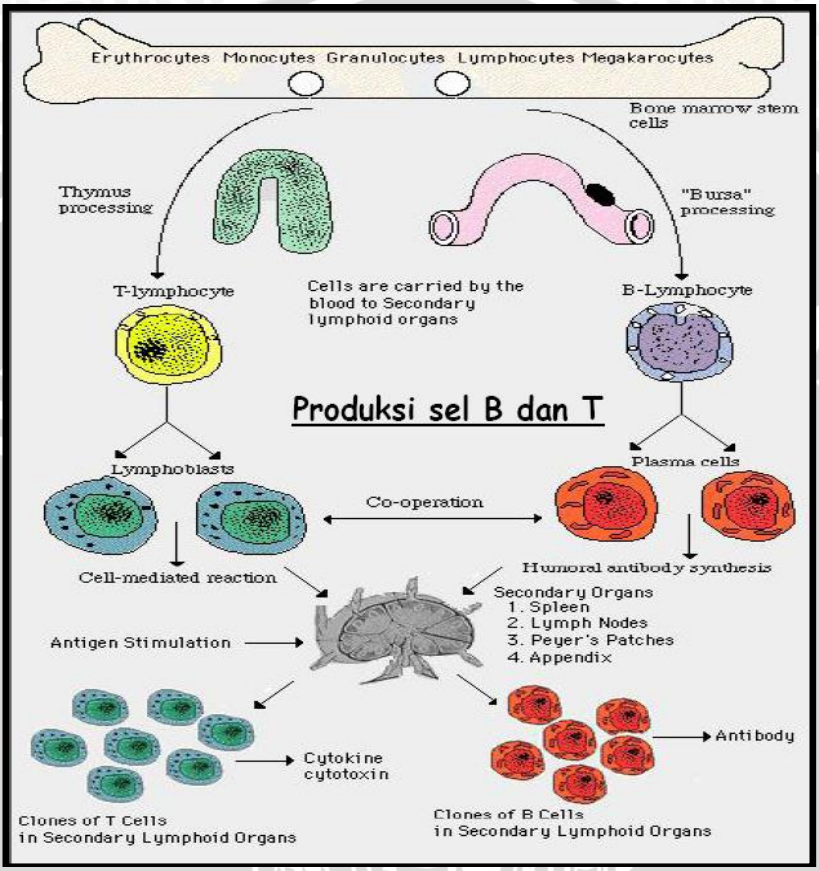
Sel limfosit merupakan sel darah putih yang dibuat di sum-sum tulang dan hati (pada janin) (Solomon, 2003). Sel limfosit yang terbentuk dalam tubuh secara umum berfungsi sebagai agen yang membentuk sistem kekebalan tubuh. Sistem kerja sel limfosit yaitu dengan cara mengenali terlebih dahulu perantara penyebab penyakit kemudian menyerangnya. Sel limfosit berdasarkan tempat pematangannya dibedakan atas dua jenis yaitu limfosit B dan T. Limfosit B adalah limfosit yang dikembangkan dan dimatangkan di sumsum tulang sedangkan limfosit T adalah limfosit yang dibentuk di sum-sum tulang akan tetapi dimatangkan di timus (Gambar 2) (Baratawidjaja & Iris, 2010).

Limfosit B merupakan bagian dari sistem kekebalan tubuh humoral, sedangkan limfosit T merupakan bagian dari kekebalan tubuh selular. Pembagian ini didasarkan dari fungsi masing-masing sel yang bertugas dalam mengatur dan mengkoordinasikan keseluruhan kerja sel kekebalan tubuh (Baratawidjaja & Iris, 2010). Kerja sel limfosit B dihasilkan dari kerja molekul kimia yang kemudian dikenal sebagai zat antibodi. Antibodi ini kemudian akan mengkaitkan dirinya dengan antigen yang sesuai (Abbas & Lichtman, 2005).

Sel T yang dimatangkan di timus diprogram khusus untuk mengenali suatu antigen secara spesifik. Kerja sel T yaitu dengan cara membunuh sel dikenali dengan serangan langsung. Sel T akan mengaitkan dirinya menuju sel yang dituju kemudian menyuntikkan zat kimia sebagai alat yang akan menghancurkan antigen (Abbas & Lichtman, 2005).

Peredaran sel B yaitu beredar bebas dalam aliran darah, akan tetapi sel B tidak mampu masuk menembus ke dalam jaringan hidup. Kondisi tersebut berkebalikan dengan komponen sel T yang dapat secara bebas melakukan pergerakan ke seluruh bagian tubuh. Komponen sel T bersama-sama dengan sel B akan mengubah bentuk sel B menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi melalui reaksi berantai. Peran sel T yang lain yaitu bertugas mengontrol produksi sel B dengan cara menghentikan

pembentukannya ketika suatu infeksi telah dihancurkan (Baratawidjaja & Iris, 2010).



Gambar 2. Proses pembentukan sel limfosit dalam tubuh (Rizkita & Anggraini, 2011)

2.4. Perkembangan dan Aktivasi Sel B

Sel B merupakan salah satu komponen sel limfosit yang dibentuk dan dimatangkan di sum-sum tulang belakang. Jumlah sel B yaitu sebanyak 5-25% dari total sel limfosit. Perkembangan sel B berasal dari sel induk hematopoetik limfosit yang telah berdiferensiasi menjadi sel progenitor B. Kondisi lingkungan mikro dengan keberadaan IL-17 yang

berasal dari stroma sum-sum tulang belakang menjadikan sel progenitor B dapat berkembang dan berdiferensiasi menjadi sel prekusor B. Sel B *imature* yang berkembang dari sel prekusor B selanjutnya akan mengalami modifikasi gen sehingga sel B akan matang (*mature*). Sel B yang telah matang akan bergerak keluar dari sum-sum tulang menuju ke dalam organ limfoid perifer (Baratawidjaja & Iris, 2010).

Sel B *naive* akan dapat berfungsi jika telah mengalami aktivasi dan diferensiasi. Hal tersebut dapat terjadi dengan kehadiran antigen ataupun komponen perangsang lain seperti kehadiran sel T helper (Th). Jalur aktivasi sel B dibedakan menjadi dua macam, yaitu aktivasi sel B yang T dependen dan aktivasi sel B yang T independen. Aktivasi sel B yang T dependen pada intinya melibatkan kerja sel Th. Sel Th akan memproduksi berbagai macam jenis sitokin yang akan memicu peningkatan ploriferasi dan diferensiasi sel B *naive*. Beberapa sitokin produk sel Th yang terlibat dalam proses tersebut diantaranya yaitu IL-4, IL-5, IL-6, IL-2 dan IFN-γ. Aktivasi sel B yang T independen tidak membutuhkan aktivitas sel T, akan tetapi melalui proses interaksi langsung dengan kehadiran antigen. Sel B yang telah teraktivasi akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang dapat memproduksi antibodi. Sebagian sel B yang telah matang akan menetap sebagai sel B memori di organ limfoid perifer (Baratawidjaja & Iris, 2010).

2.5. Perkembangan dan Aktivasi Sel T $CD4^+CD25^+$

Sel T terdiri atas berbagai macam subset sel yang diantaranya yaitu sel T *naive*, $CD4^+$, $CD8^+$, *Natural Killer T cell* (NKT), dan sel T regulator (Treg). Perkembangan sel T seperti yang telah diketahui terjadi di sum-sum tulang belakang, akan tetapi sel T dimatangkan di organ tymus. Pematangan sel T melalui proses seleksi positif dan negatif berdasarkan afinitasnya terhadap *self* antigen. Sel T dengan afinitas tinggi terhadap *self* antigen akan dihancurkan dalam proses seleksi tersebut malalui proses apoptosis agar tidak dikeluarkan ke tubuh. Sel T dengan afinitas rendah melalui seleksi positif akan dikeluarkan dari timus, sedangan sel T

dengan afinitas sedang akan dikeluarkan sebagai sel Treg melalui mekanisme seleksi negatif (Baratawidjaja & Iris, 2010).

Sel T *naive* merupakan sel T yang telah matang melalui proses seleksi positif serta belum pernah terpajan antigen dan selanjutnya dibawa ke organ limfoid perifer untuk dilakukan proses aktivasi serta diferensiasi. Penanda bagi sel T *naive* adalah kehadiran molekul permukaan CD45RA dan $CD62L^+$ (Baratawidjaja & Iris, 2010 dan Rifa'i, 2011).

Sel T $CD4^+$ *naive* diaktivasi oleh kehadiran antigen yang telah ditangkap, diproses, dan dipresentasikan oleh APC dalam kompleks MHC-II yang nantinya akan berikatan dengan reseptor pada sel T $CD4^+$ itu sendiri. Sel T $CD4^+$ yang teraktivasi akan mengekspresikan IL-2R dan memproduksi sitokin IL-2 yang bersifat autokrin. Produk IL-2 autokrin berfungsi untuk memicu poliferasi sel T $CD4^+$ itu sendiri. Sel T $CD4^+$ yang berpoliferasi dan berdiferensi selanjutnya akan berkembang menjadi subset sel Th 1 dan Th 2. Sel Th 1 dan Th 2 akan mensintesis produk sitokin yang akan memicu pengaktifan sel T $CD8^+$, makrofag, NK, dan sel B (Baratawidjaja & Iris, 2010).

Sel T $CD4^+CD25^+$ merupakan molekul marker permukaan bagi subset sel Treg. Akan tetapi identifikasi sel Treg akan lebih bersifat spesifik jika dilakukan hingga identifikasi keberadaan molekul faktor transkripsi FoxP3 dalam sel Treg. FoxP3 merupakan molekul yang memainkan peranan kunci dalam perkembangan sel T $CD4^+CD25^+$ serta sebagai molekul transkripsi yang menginduksi ekspresi $CD25^+$. Beberapa penelitian mengenai identifikasi sel Treg menunjukkan bahwa tidak semua sel Treg $CD25^+$ menunjukkan hasil positif untuk identifikasi FoxP3, begitupun sebaliknya sel Treg $FoxP3^+$ tidak akan selalu menunjukkan hasil positif untuk identifikasi $CD25^+$ (Askenasy, dkk., 2008).

Sel Treg berasal dari timosit yang berada di timus dan dibentuk melalui proses seleksi negatif. Timosit yang memiliki afinitas intermediet terhadap *self* antigen akan meningkatkan faktor transkripsi FoxP3. Kondisi tersebut yang akan menjadikan timosit berkembang menjadi sel Treg

(Baratawidjaja & Iris, 2010). Jenis sel Treg ini lebih dikenal dengan istilah *natural* Treg (n Treg). Jenis sel Treg lain yaitu sel Treg adaptif. Sel Treg adaptif secara umum jika ditinjau dari segi asal pembentukan dan bentuk aksi yang dilakukan memiliki perbedaan dengan n Treg. Sel Treg adaptif hadir di daerah periperal selama respon imun berlangsung, terutama berasal dari sel TCD4 *naive*. Sel Treg bekerja secara spesifik terhadap antigen yang ditriger dengan sistem imun. Aktivitas Treg yaitu berperan dalam mensupresi respon imun melalui sekresi sitokin (Trzonkowski, dkk., 2009).

Sel Treg dalam sistem imun diduga memiliki peran sebagai sel imunoregulasi yang mensupresi beberapa respon imun seperti respon imun terhadap *self* antigen, alloantigen, antigen tumor, dan patogen (Baratawidjaja & Iris, 2010). Peran imunoregulasi tersebut dapat dilakukan melalui tiga mekanisme modulasi reaksi imun, yaitu: 1) Pemusnaahan langsung sebagai sel sitotoksik melalui kontak langsung antar sel ke sel, 2) Menghambat produksi sitokin terutama IL-2, melalui sel sitotoksik, dan 3) Sekresi langsung sitokin yang bersifat sebagai imunomodulator, terutama sitokin TGF-β dan IL-10 (Askenasy, dkk., 2008).

2.6. Gambaran Umum Propolis

Propolis merupakan salah satu produk alam yang dihasilkan oleh lebah. Kata propolis sendiri berasal dari bahasa Yunanai, yaitu kata "*Pro*" yang berarti di depan atau sebelum dan kata "*Polis*" yang berarti kota. Istilah kata tersebut menggambarkan kegunaan propolis sebagai bahan pelindung bagi pintu masuk sarang lebah dari berbagai serangan, seperti gangguan berbagai organisme serta gangguan kondisi lingkungan yang tidak mendukung. Masyarakat mulai menggunakan propolis sebagai bahan obat tradisional sejak tahun 1900-an. Propolis telah banyak dianjurkan penggunaannya sebagai obat alami di dunia barat. Hal ini didukung oleh adanya aktivitas penelitian mengenai komposisi penyusun propolis beserta manfaatnya pada tahun 1973-1994 oleh *International Bee Research Institute*, Cardiff, Inggris (Suranto, 2010).

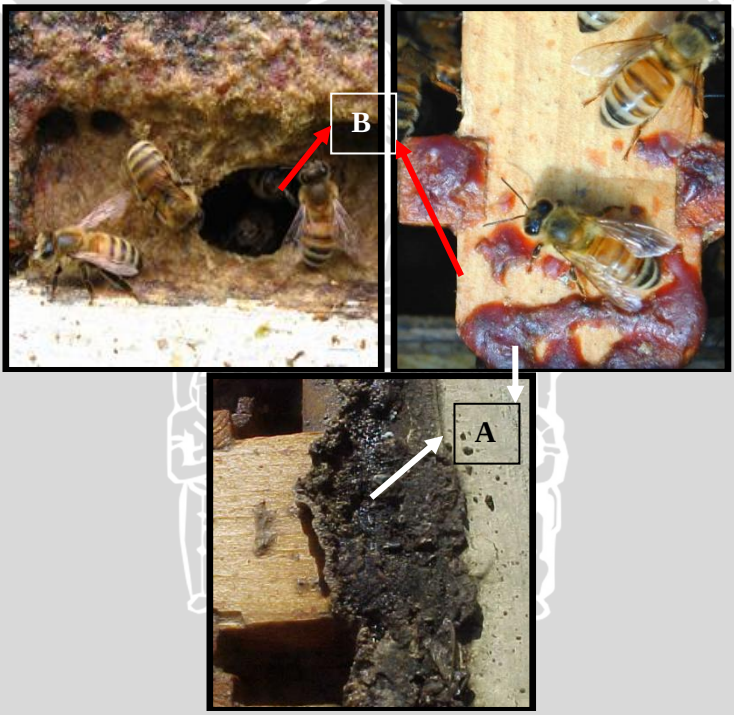
Setiap lebah memiliki kemampuan untuk memproduksi madu dan propolis. Terdapat lebih dari 20.000 spesies lebah yang tersebar di dunia (Maharani, dkk., 2011 dan Siregar, dkk., 2011). Jenis lebah yang dapat menghasilkan propolis salah satunya yaitu *Trigona* sp. (Gambar 3). Lebah *Trigona* sp. termasuk dalam famili Meliponidae dan berasal dari kawasan Asia. Sifat lebah ini tidak berbahaya karena tidak memiliki sengat seperti yang dimiliki kebanyakan lebah pada umumnya seperti yang dimiliki kelompok Apis. Oleh karena itu *Trigona* sp. memiliki kemampuan menghasilkan substansi propolis lebih banyak dibanding Apis sebagai bahan untuk pertahanan diri mereka (Maharani, dkk., 2011).

Gambar 3. *Trigona* sp. jenis lebah penghasil propolis dan madu (Suranto, 2010)

Substansi propolis berasal dari campuran produk turunan yang dihasilkan oleh tumbuhan (Fatahinia, dkk., 2012). Campuran produk turunan tersebut kemudian dikumpulkan oleh lebah pekerja dari berbagai bagian tumbuhan, seperti bagian bunga, kuncup cabang atau kuncup daun, kulit tumbuhan, dan bagian-bagian lain dari tanaman. Lebah kemudian memodifikasi produk turunan tanaman ini menggunakan berbagai enzim seperti enzim β-glycosidase yang terdapat di air liur (saliva) lebah serta berbagi enzim

lainnya dan selanjutnya mencampurkannya dengan bahan lilin yang terdapat pada sarang lebah. Aktivitas lebah itulah yang akan menghasilkan propolis (Silva, dkk., 2011 dan Taebe, dkk., 2012).

Propolis secara umum dapat ditemukan di bagian pintu masuk dan bagian tepi sarang lebah (Gambar 4). Warna propolis dapat beragam; diantaranya yaitu kuning terang, hijau, coklat kemerahan hingga coklat gelap. Warna tersebut ditentukan oleh sumber tumbuhan yang digunakan lebah untuk memperoleh substansi yang akan dioleh menjadi propolis. Propolis juga memiliki bau beragam dan hal tersebut juga tergantung pada sumber tumbuhannya (Suranto, 2010).



Gambar 4. Letak propolis pada sarang lebah. A. Gumpalan propolis dan B. Pintu masuk sarang lebah (Insectexpertphd, 2010, Canada Agriculture & Food Museum, 2014 dan Helsinki, 2014)

2.6.1. Kandungan Kimia dan Manfaat Propolis

Propolis mengandung beberapa senyawa dan bahan organik. Komposisi kimiawi dalam propolis secara umum yaitu terdiri atas 50% resin (mengandung flavonoid dan asam fenolik), 30% lilin, 10% minyak esensial, 5% polen, dan 5% bahan organik lainnya (Pellati, dkk., 2014). Kandungan kimia dalam propolis akan tetapi tergantung dari karakteristik fitogeografi tempat untuk lebah mengkoleksi bahan resin. Habitat dapat berpengaruh pada kebergaman jenis tanaman yang digunakan lebah sebagai sumber untuk memproduksi propolis. Perbedaan kandungan kimia dalam propolis juga dapat disebabkan dari penggunaan jenis pelarut. Penggunaan jenis pelarut yang berbeda dapat memungkinkan hasil ekstraksi dengan kandungan senyawa kimia yang berbeda. Hal tersebut sekaligus akan mempengaruhi aktivitas dari ekstrak propolis yang dihasilkan (Sforcin & Vassya, 2011).

Kombinasi berbagai zat kimia dalam propolis menjadikan propolis banyak dimanfaatkan dan digunakan oleh masyarakat sebagai salah satu jenis obat tradisional. Propolis sebagai obat tradisional dimanfaatkan sebagai obat anti-inflamasi, antibakterial, antiparasit, antifungi, antitumor, antioksidan, dan memiliki efek imunomodulator (Fatahinia, dkk., 2012). Efek imunomodulator propolis dapat terlihat dari berbagai hasil penelitian yang dilakukan. Pemberian ekstrak etanol *Brazilian green* propolis dosis 200mg/kg pada mencit selama 3 hari diketahui mampu mengupregulasi ekspresi TLR-4 dan TLR-2 serta produksi sitokin proinflamasi (IL-1 dan IL-6) oleh makrofag dan sel *spleen*. Mencit yang ditreatment dengan ekstrak etanol propolis *Brazilian green* propolis dosis 200mg/kg selama 14 hari menunjukkan adanya penghambatan IL-1, IL-6, IFN-γ, IL-2 dan IL-10 yang diproduksi oleh sel *spleen*. *Brazilian green* propolis 10 % mampu meningkatkan stimulasi produksi antibodi (Sforcin & Vassya, 2011).

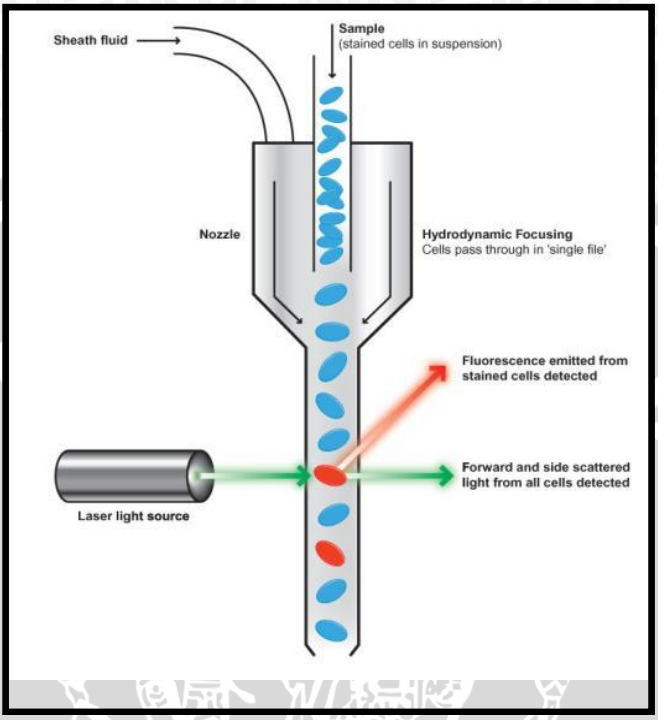
Beberapa senyawa dalam ekstrak etanol propolis telah diketahui memiliki efek imunomodulator. Senyawa-senyawa tersebut diantaranya yaitu senyawa CAPE (*Caffeic*

Acid Phenethyl Ester), flavonoid quercetin dan hesperidin, dan Artepilin C (Art-C) (Cheunga, dkk., 2011 dan Sforcin & Vassya, 2011).

2.7. Flowcytometri

Flowcytometri didefinisikan sebagai suatu pengukuran secara simultan pada beberapa karakteristik fisik dari sebuah sel tunggal sebagai aliran sel dalam suatu suspensi yang melewati suatu alat pengukur. Metode ini merupakan suatu uji klinis laboratorium yang digunakan untuk mendiagnosa dan memonitoring suatu penyakit (Robert, 2003). Flowcytometri pertama kali ditemukan oleh Wallace Coulter pada tahun 1950. Instrumen flowcytometri membutuhkan sampel sel-sel dalam suspensi. Sampel darah merupakan sampel paling ideal untuk digunakan dalam analisis flowcytometri. Hal ini dikarenakan darah merupakan sel-sel yang berada dalam kondisi tersuspensi sehingga mudah untuk dianalisis (Bakke, 2001).

Prinsip kerja dari flowcytometri yaitu dengan cara menggunakan resistensi sel dalam arus listrik ketika melewati sebuah lubang untuk menentukan jumlah dan ukuran partikel. Flowcytometri secara spesifik menggunakan pengukuran berdasarkan fluorosensi dengan sumber cahaya yang berasal dari cahaya laser (Gambar 5). Penghamburan cahaya pada laser flowcytometri digunakan untuk mengukur ukuran intrinsik dan granulitas dari suatu sel yang dianalisis. Fluoresensi juga dapat digunakan untuk mengukur parameter ekstrinsik seperti ekspresi protein spesifik dan kandungan asam nukleat, dengan adanya penambahan reagen tertentu. Reagen tersebut dapat berupa pewarna fluorosen dan antibodi (Bakke, 2001).



Gambar 5. Proses pengukuran sel darah berdasarkan fluorosensi (Hall, 2010)

BAB III
METODE

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen dan bertujuan untuk membuktikan bioaktivitas ekstrak etanol propolis terhadap perubahan kwantitas sel limfosit *spleen* secara *in-vivo*. Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode rancangan acak lengkap yang terdiri dari 3 kelompok dosis yang diberi terapi ekstrak etanol propolis dan satu kelompok kontrol negatif (mencit sehat tanpa pemberian ekstrak etanol propolis).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan September 2013 hingga Juni 2014. Tempat untuk penelitian ini yaitu di Laboratorium Anatomi Fisiologi Hewan dan *Animal Room*, Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya Malang; serta Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.3. Prosedur Kerja Penelitian

3.3.1. Deskripsi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c berumur 8 minggu dalam keadaan *phatogen free* (bebas penyakit) dengan berat badan ± 25 gram. Mencit sebanyak 24 ekor dan pakan dibeli dari peternak mencit di Jember dengan sertifikasi *phatogen free*. Setiap kandang steril diberi serutan kayu secukupnya dan diisi sebanyak 6 ekor mencit. Kandang yang berisi mencit ditutup dengan ram-raman kawat dan diberi 1 botol air minum. Aklimatisasi mencit dilakukan selama tujuh hari agar dapat beradaptasi pada lingkungan yang baru. Selama masa aklimatisasi dan perawatan; kandang dibersihkan, diganti dengan sekam baru, dan mencit disemprot alkohol setiap 3 hari sekali. Mencit diberi pakan berupa biskuit pelet dan air minum berupa air mineral dalam jumlah cukup setiap harinya.

3.3.2. Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode rancangan acak lengkap yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan dengan 6 ulangan untuk tiap perlakuan. Kelompok perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	**Treatment Ekstrak Etanol Propolis**
Kontrol (-)	Tidak
Kelompok Dosis 1 (D1)	Ya (dosis 50 mg/kg BB)
Kelompok Dosis 2 (D2)	Ya (dosis 100 mg/kg BB)
Kelompok Dosis 3 (D3)	Ya (dosis 200 mg/kg BB)

3.3.3. Ekstraksi Propolis dengan Metode Maserasi

Propolis mentah didapat dari peternak lebah di daerah Lawang, Kabupaten Malang. Bahan propolis mentah diambil dengan cara dicuplik dari tepian sarang lebah yang diternakan untuk kemudian digumpalkan. Gumpalan propolis mentah ditimbang sebanyak 200 gr, dimaserasii dengan etanol absolut sebanyak 1 L. Larutan hasil maserasi disaring dan dievaporasi dengan evaporator selama ± 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 ekstrak (*crude* ekstrak) propolis yang diperoleh diambil dan diletakkan dalam botol dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4˚C.

3.3.4. Pemberian Ekstrak Etanol Propolis pada Hewan Coba secara Oral

Setiap mencit dalam kelompok perlakuan dosis diberi terapi ekstrak etanol propolis dengan berbagai dosis. Kelompok perlakuan dosis 1 diberi ekstrak etanol propolis

dengan dosis 50 mg/kg BB, kelompok perlakuan dosis 2 diberi ekstrak etanol propolis dengan dosis 100 mg/kg BB, dan kelompok perlakuan dosis 3 diberi ekstrak etanol propolis dengan dosis 200 mg/kg BB. Pemberian ekstrak etanol propolis pada kelompok perlakuan dosis dilakukan selama empat belas hari dengan cara ekstrak etanol propolis dilarutkan dengan air mineral sesuai dengan kebutuhan dosis untuk kemudian diberikan pada mencit dengan teknik oral (sonde). Kelompok mencit kontrol tidak diberi treatmen ekstrak etanol propolis.

3.3.5. Dislokasi Hewan Coba dan Pengambilan Organ Spleen

Mencit dibunuh dengan mendislokasi bagian leher mencit. Mencit yang telah terbunuh dibedah bagian ventralnya untuk mengisolasi organ *spleen. Spleen* yang telah terambil direndam dalam PBS steril.

3.3.6. Analisis Flowcytometri

Analisis flowcytometri dilakukan untuk mengetahui jumlah populasi dari sel yang mengekspresikan $CD4^{+}CD25^{+}$ dan B220. *Spleen* diambil dan diletakkan pada cawan petri. Organ *spleen* kemudian digerus dalam PBS. Sampel *spleen* disaring menggunakan *wire*. Homogenat ditampung dalam propilen kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, pada suhu 4° C selama 5 menit. Pelet yang terpisah dari supernatan kemudian ditambah PBS 1 ml dan dihomogenkan. Homogenat kedua kemudian diambil 50 µl dan diletakkan dalam mikrotube berisi 500 µl PBS. Homogenat dalam mikrotube disentrifugasi kembali pada kecepatan 2500 rpm, pada suhu 4° C selama 5 menit. Pelet selanjutnya ditambah larutan antibodi (anti-CD4, anti-CD25, dan anti B220) masing-masing sebanyak 50 µl, yang bersifat spesifik terhadap sel yang mengekspresikan $CD4^{+}CD25^{+}$ dan B220. Jumlah sel limfosit yang mengekspresikan $CD4^{+}$ $CD25^{+}$ dan B220 selanjutnya dihitung dengan memasukkan kuvet berisi pelet dan antibodi yang telah diresuspensi dengan PBS 300 µl ke dalam alat flowcytometri.

3.4. Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan *software* CellQuest dan selanjutnya diuji dengan analisa statistik non parametrik berupa uji Kruskall Wallis. Data yang diuji dengan uji Kruskall Walis apabila menunjukkan hasil signifikan maka data diuji dengan uji lanjutan Mann Whitney. Taraf kepercayaan yang digunakan yaitu 95% ($p<0,05$). Analisa data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 *for* Windows.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

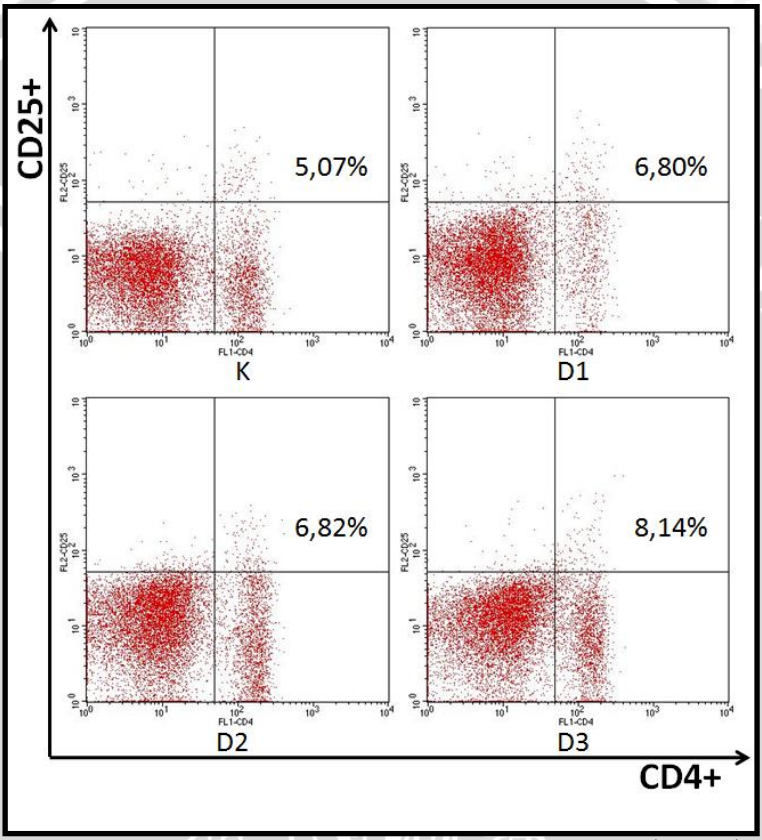
4.1. Jumlah Relatif Sel $CD4^+CD25^+$ terhadap Populasi Sel $CD4^+$

Pemberian ekstrak etanol propolis pada kelompok perlakuan mencit menunjukkan pengaruh yang berbeda pada jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$. Profil persentase jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$ berdasarkan hasil analisis flowcitometri memiliki kecenderungan peningkatan persentase jumlah relatif sel dari perlakuan kontrol hingga perlakuan D3 (Gambar 6). Kelompok perlakuan kontrol (mencit tanpa pemberian ekstrak etanol propolis) memiliki jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ dengan persentase terendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan D1, D2, dan D3.

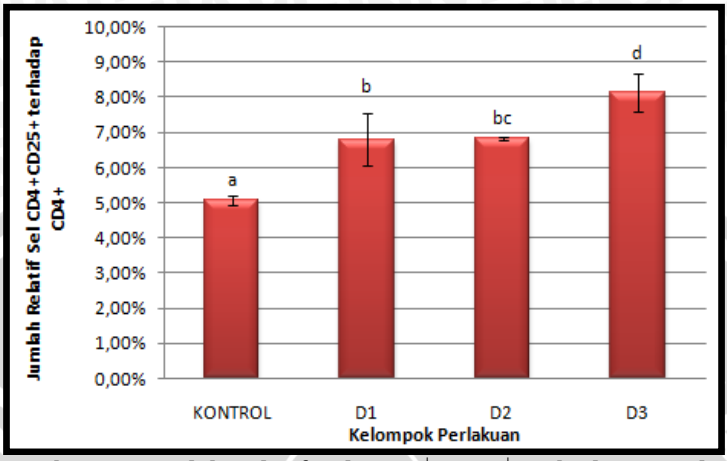
Pemberian ekstrak etanol propolis pada kelompok perlakuan D1, D2, dan D3 secara umum memberikan pengaruh signifikan ($P<0,05$) terhadap perubahan jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ jika dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak etanol propolis berdasarkan uji Mann Whitney yang dilakukan (Gambar 7). Jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ pada kelompok kontrol hanya sebesar 5,07%. Peningkatan tertinggi jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$ antar kelompok dosis terjadi pada kelompok perlakuan D3. Ekstrak etanol propolis dengan dosis 200 mg/kg BB mencit memberikan pengaruh signifikan terhadap peningkatan jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ yaitu menjadi 8,14% jika dibandingkan dengan pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis pada dosis 50 mg/kg BB mencit dan dosis 100 mg/kg BB mencit.

Pemberian ekstrak etanol propolis dengan dosis 50 mg/kg BB mencit akan tetapi hanya mampu menaikkan jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ menjadi 6,80% dan dosis 100 mg/kg BB mencit mampu menaikkan jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ menjadi 6,82%. Hasil tersebut berdasarkan uji Mann Whitney yang dilakukan tidak menunjukkan perbedaan pengaruh secara signifikan antara perlakuan D1 dan D2.

Semakin besar jumlah dosis yang diberikan maka semakin besar pula kenaikan jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$. Hal tersebut sekaligus menunjukkan bahwa jumlah sel Treg ($CD4^{+}CD25^{+}$) yang teraktivasi dalam populasi sel T $CD4^{+}$ juga semakin meningkat.



Gambar 6. Profil persentase jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ terhadap populasi sel $CD4^{+}$ hasil analisa flowcytometri pada setiap perlakuan (K= Kontrol, D1= Dosis 50 mg/kg BB, D2= Dosis 100 mg/kg BB, dan D3= Dosis 200 mg/kg BB)



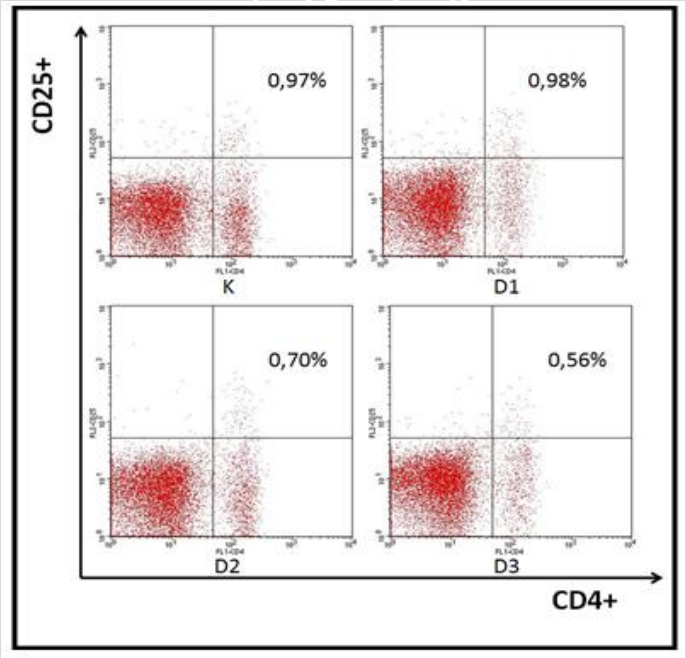
Gambar 7. Jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ terhadap populasi sel $CD4^{+}$ antar kelompok perlakuan mencit setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol propolis selama 2 minggu secara oral

Peningkatan jumlah relatif sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dalam poulasi sel T $CD4^{+}$ menunjukkan bahwa proses aktivasi dan diferensiasi sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ meningkat. Sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dapat berasal dari populasi sel T CD4 *naive* yang teraktivasi. Jenis sel Treg ini disebut sebagai sel Treg adaptif. Sel Treg adaptif hadir di daerah periperal selama respon imun berlangsung (Trzonkowski, dkk., 2009).

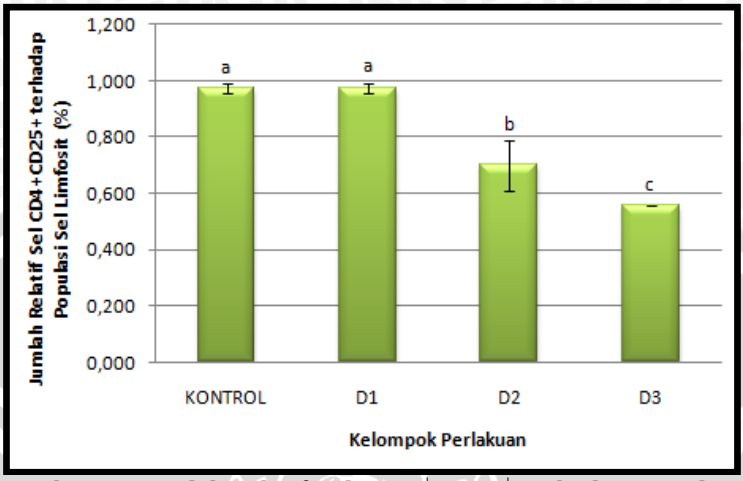
Sel T Regulator ($CD4^{+}CD25^{+}$) merupakan bagian dari sistem imun *innate*. Jenis sel ini memiliki fungsi utama dalam menjaga kondisi *self-tolerance* sehingga banyak dimanfaatkan dalam proses pengobatan berbagai penyakit autoimun. Sel $CD4^{+}25^{-}$ dapat berubah menjadi $CD4^{+}25^{+}$ karena sel T CD4 terstimulasi oleh adanya pengaruh suatu jenis zat dengan sifat imunomodulator (Rifa'i, 2010). Menurut hasil penelitian yang dilakukan dengan demikian dapat mengasumsikan bahwa dalam ekstrak etanol propolis terdapat kandungan senyawa aktif yang mampu menstimulasi peningkatan dan aktivasi jumlah sel T Regulator ($CD4^{+}CD25^{+}$) dalam populasi sel T $CD4^{+}$.

4.2. Jumlah Relatif Sel $CD4^+CD25^+$ terhadap Populasi Sel Limfosit

Perubahan persentase jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit akibat pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis antar kelompok perlakuan secara umum menunjukkan pola penurunan, berdasarkan hasil analisis flowcytometri yang dilakukan (Gambar 8). Pemberian ekstrak etanol propolis pada perlakuan D1 tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap perubahan jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Persentase jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ pada kelompok kontrol yaitu sebesar 0,97% tidak jauh berbeda pada kelompok D1 yaitu sebesar 0,98%.



Gambar 8. Profil persentase jumlah relatif sel $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit hasil analisa flowcytometri pada setiap perlakuan (K= Kontrol, D1= Dosis 50 mg/kg BB, D2= Dosis 100 mg/kg BB, dan D3= Dosis 200 mg/kg BB)



Gambar 9. Jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ terhadap populasi sel limfosit antar kelompok perlakuan mencit setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol propolis selama 2 minggu secara oral

Dosis ekstrak etanol propolis berpengaruh secara signifikan (P<0,05) pada penurunan jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ terhadap populasi sel limfosit antar kelompok perlakuan D1, D2, dan D3, berdasarkan uji Mann Whitney yang dilakukan (Gambar 9). Jumlah relatif sel paling rendah akibat pengaruh secara signifikan pemberian ekstrak etanol propolis terlihat pada kelompok perlakuan D3 dengan persentase sebesar 0,56%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol propolis dosis 100 dan 200mg/kg BB berpengaruh menurunkan jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ sedangkan dosis 50 mg/kg BB berpengaruh dalam meningkatkan jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ akan tetapi tidak secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol.

Jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ dalam populasi sel limfosit akibat pemberian ekstrak etanol propolis diketahui mengalami penurunan seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan pada mencit. Hal tersebut dimunkinkan dapat terjadi karena peningkatan dosis pemberian ekstrak etanol propolis pada mencit akan menigkatkan jumlah sel imunokompeten

lain diluar sel $CD4^+CD25^+$. Jumlah aktivasi sel imunokompeten lain yang terjadi dalam populasi sel limfosit dapat lebih besar jika dibandingkan dengan jumlah sel $CD4^+CD25^+$ yang teraktivasi itu sendiri. Sel T reg selain berasal dari populasi sel T CD4 juga diketahui dapat berasal dari populasi sel CD8 dengan penandaan $CD8^+CD122^+$. Menurut penelitian Rifa'i dkk. (2004) sel $CD8^+CD122^+$ memiliki kemampuan dalam mengkontrol sel CD8 dan CD4 yang teraktifasi melalui studi *in-vivo* dan *in-vitro* yang dilakukan. Populasi $CD8^+CD122^+$ dengan demikian mampu digunakan mengontrol keberadaan sel T yang memiliki potensi bahaya (abnormal).

Kandungan suatu senyawa dalam propolis diketahui juga ada yang bersifat sebagai imunosupresan. Salah satu senyawa tersebut yaitu Artepilin C (Art-C). Sifat imunosupresan dari Art-C ini salah satunya yaitu bertindak dalam menekan persentase jumlah sel T $CD4^+CD25^+$ dan produksi sitokin IL-10 dalam kultur sel limfosit secara *in vitro*. Fungsi dari sel T reg $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ dimediasi melalui produksi IL-10 and TGFβ (Lee & Rifa'i, 2011). Sitokin TGF-β dan IL-10 diketahui memiliki peranan terhadap proses diferensiasi sel Treg (Cheunga, dkk., 2011). Sitokin IL-10 dapat berperan secara autokrin terhadap sel Treg terutama berfungsi untuk mempertahankan ekspresi FoxP3 (Murai, dkk., 2009). Penurunan secara signifikan jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ dalam penelitian ini dengan demikian juga dapat terjadi akibat adanya kandungan senyawa Art-C dalam propolis yang bersifat sebagai imunosupresan sebagai mana hasil penelitian yang dilakukan oleh Cheunga, dkk. (2011).

Pemberian ekstrak etanol propolis Brazil dengan dosis 200 mg/kg BB selama 14 hari pada mencit diketahui mampu menghambat produksi IL-1, IL-6, IFN-γ, IL-2 dan IL-10 oleh sel *spleen* (Fatahinia, dkk., 2012 dan Missima dkk., 2009 dalam Sforcin & Vassya, 2011). Senyawa CAPE dalam propolis diketahui mampu menghambat aktivasi, transkripsi gen IL-2, dan ekspresi IL-2R (CD25), dan proliferi dari sel T pada manusia. Proses tersebut dapat terjadi dengan kerja senyawa CAPE yang menghambat faktor transkripsi NFAT

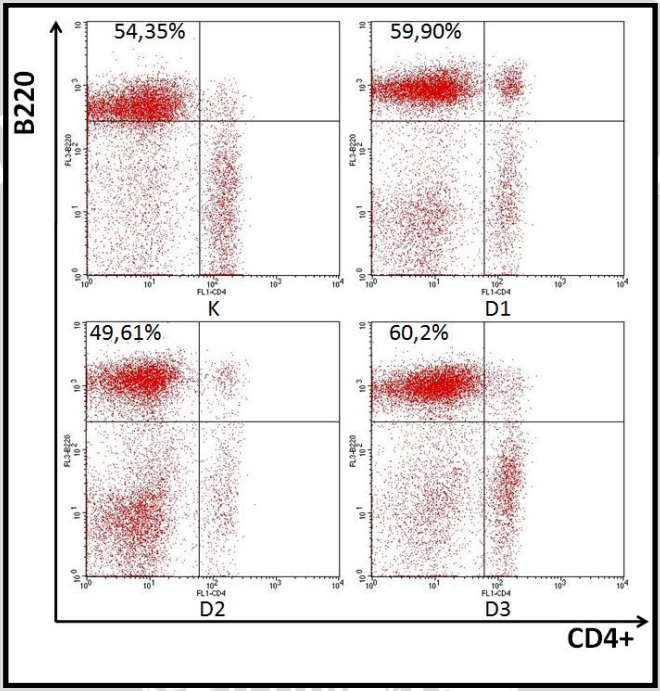
dan NF-Kb (Marquez dkk., 2004). IL- 2 merupakan salah satu jenis sitokin yang mampu menstimulasi aktivasi dan diferensiasi sel Treg (Nelson, 2004). Sel Treg yang telah bearada di daerah periperal akan dipelihara melalui keberadaan IL-2, meskipun IL-2 tidak berperan penting terhadap perkembangan sel Treg di thymus (Maloy & Fiona, 2005). Oleh karena itu apabila jumlah IL-2 berkurang setelah pemberian ekstrak etanol propolis maka hal tersebut dapat berhubungan erat dengan penurunan jumlah sel Treg dalam populasi sel limfosit. Pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis pada mencit terhadap supresi jumlah relatif sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dalam populasi sel limfosit dengan demikian dapat disebabkan karena adanya kandungan senyawa CAPE yang bersifat imunosupresor.

Sel Treg merupakan salah satu populasi sel limfosit yang dicirikan dengan ekspresi molekul permukaan $CD25^{+}$ dalam jumlah tinggi. Molekul marker lain akan tetapi juga memberikan ciri yang lebih spesifik bagi sel Treg (Campbell & Ziegler, 2007). Sel Treg secara spesifik dapat diidentifikasi dengan keberadaan FoxP3. Molekul faktor transkripsi FoxP3 dalam sel Treg merupakan molekul yang memainkan peranan kunci dalam perkembangan sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ serta sebagai molekul transkripsi yang menginduksi ekspresi $CD25^{+}$ (Askenasy, dkk., 2008). Pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis dalam penelitian ini akan tetapi hanya sampai pada penandaan sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dan tidak dilakukan hingga identifikasi keberadaan FoxP3. Oleh karena itu hasil pemberian ekstrak etanol propolis dalam penelitian ini belum dapat menjelaskan secara lebih spesifik mengenai bagaimana pengaruhnya terhadap perubahan relatif sel Treg yang sebenarnya pada populasi sel limfosit.

4.3. Jumlah Relatif Sel B220

Perlakuan pemberian ekstrak etanol propolis pada mencit memberikan pengaruh yang beragam terhadap profil persentase jumlah relatif sel B220 pada masing-masing kelompok perlakuan (Gambar 10). Pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis secara signifikan ($P<0,05$) terhadap

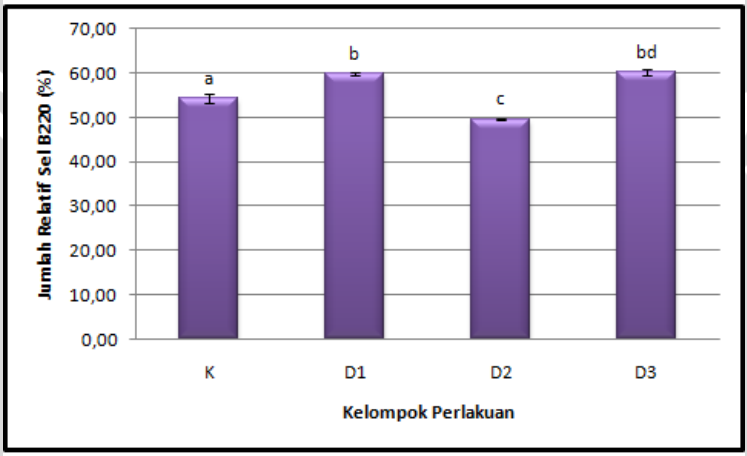
perbedaan jumlah sel relatif B220 pada mencit terlihat pada kelompok perlakuan D1, D2, dan D3 jika dibandingkan dengan jumlah relatif sel B220 pada kelompok perlakuan kontrol (Gambar 11). Pengaruh tersebut ditunjukkan dari adanya peningkatan dan penurunan secara signifikan pada jumlah relatif sel B220.



Gambar 10. Profil persentase jumlah relatif sel B220 hasil analisa flowcytometri pada setiap perlakuan (K= Kontrol, D1= Dosis 50 mg/kg BB, D2= Dosis 100 mg/kg BB, dan D3= Dosis 200 mg/kg BB)

Peningkatan jumlah relatif sel B220 dipengaruhi secara signifikan melalui pemberian ekstrak etanol propolis dengan dosis D1 (50 mg/kg BB) dan dosis D3 (200 mg/kg BB). Jumlah relatif sel B220 pada perlakuan D1 meningkat dibanding kontrol, yaitu sebesar 59,90%. Hal tersebut juga

tidak jauh berbeda dengan jumlah relatif sel B220 pada perlakuan D3 dengan persentase sebesar 60,02%. Peningkatan jumlah relatif sel B220 akibat pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis akan tetapi tidak berbeda secara signifikan antara kelompok perlakuan D3 dengan D1. Pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis dalam menurunkan jumlah relatif sel B220 secara signifikan terlihat pada perlakuan D2 dengan jumlah relatif sel B220 hanya sebesar 49,61%.



Gambar 11. Jumlah relatif sel B220 antar kelompok perlakuan mencit setelah dilakukan pemberian ekstrak etanol propolis selama 2 minggu secara oral

Hasil penelitian menunjukkan adanya ketidakstabilan pola perubahan jumlah relatif sel B220 akibat adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol propolis. Kenaikan jumlah relatif sel B220 dalam populasi limfosit pada kelompok perlakuan D1 dan D3 menunjukkan bahwa kandungan senyawa dalam propolis pada rentang dosis tersebut diasumsikan dapat meningkatkan jumlah relatif sel B220 dalam populasi sel limfosit. Pengaruh ekstrak etanol propolis pada penurunan jumlah relatif sel B220 secara signifikan yang terjadi pada kelompok perlakuan D2 menunjukkan adanya suatu mekanisme supresor yang terjadi.

Asumsi yang dapat terbangun untuk menjelaskan fenomena tersebut adalah pada rentang dosis 100 mg/kg BB mencit dimungkinkan merupakan dosis yang dapat memaksimalkan kerja molekul-molekul supresor untuk mengurangi jumlah relatif sel B220 dalam populasi sel limfosit. Penelitian yang dilakukan oleh Draganova, dkk. (2010) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol propolis Bulgarian pada konsentrasi rendah 1 and 2.5 mg/L mampu meningkatkan proliferasi sel B pada kultur sel PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells).* Penggunaan konsentrasi tinggi sebesar 10 mg/L di sisi lain dapat menginduksi apoptosis pada sel limfosit B hingga mencapai 56.08 %. Ekstrak etanol propolis dengan konsentrasi rendah lebih disukai seluruh populasi sel untuk menunjang aktivitas proliferasi dan hal tersebut juga akan memberikan pengaruh perlindungan bagi limfosit B. Oleh karena itu dapat diasumsikan bahwa ekstrak etanol propolis dengan dosis rendah (D1) merupakan dosis terbaik untuk meningkatkan jumlah relatif sel B220.

Propolis diketahui memiliki kemampuan dalam meningkatkan aktivasi makrofag dan sel limfosit T. Sel makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan produk berbagai macam sitokin, yaitu IL-1,IL-6,IL-12, dan TNF-α. Produk sitokin yang dihasilkan oleh makrofag sekaligus akan menstimulus aktivasi sel T. Peningkatan aktivasi sel T akan memberikan kemungkinan dalam meningkatkan produksi IFN-γ. Pengaktifan sel T $CD4^+$ akan berdampak pada proses diferensiasi sel T $CD4^+$ menjadi sel Th1. Sel Th1 inilah yang memiliki kontribusi dalam produksi IL-2 dan IFN- γ (Rifa'i, dkk., 2008).Produk IFN-γ diketahui memiliki aktivitas dalam menekan proses diferensiasi sel B (Takagi dkk., 2005 dalam Mustafiah, dkk., 2011). Jumlah IFN-γ yang diproduksi oleh makrofag jika terlalu banyak, maka dapat menghambat proliferasi sel B dan T (Baratawidjaja & Iris, 2010). Oleh karena itu kandungan senyawa dalam propolis diasumsikan mampu menekan produksi respon imun humoral akibat adanya peningkatan produksi respon iumun seluler.

BAB V
PENUTUP

5.1. Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak etanol propolis pada dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 200 mg/kg BB mampu memberikan pengaruh signifikan terhadap perubahan jumlah relatif sel $CD4^{+}CD25^{+}$ dan sel B B220 pada mencit Balb/c.
2. Pemberian ekstrak etanol propolis dengan dosis 50 mg/kg BB merupakan dosis ekstrak etanol propolis yang optimal untuk meningkatkan sel-sel limfosit pada mencit Balb/c berdasarkan perubahan kwantitas sel T $CD4^{+}CD25^{+}$ dan sel B B220.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian dengan pemberian treatment ekstrak etanol propolis dalam jangka waktu yang berbeda-beda sehingga dapat diketahui modulasi sistem imun secara lebih baik berkaitan dengan efek imunomodulator ekstrak etanol propolis terhadap sel-sel imunokompeten.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek pemberian ekstrak etanol propolis pada mencit Balb/c yang diinduksi dengan suatu model penyakit agar diketahui efek dari ekstrak etanol propolis terhadap sel-sel imunokompeten pada mencit dalam kondisi sakit.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek pemberian ekstrak etanol propolis secara *in-vitro* melalui uji dalam kultur sel, agar diketahui efek ekstrak etanol propolis terhadap suatu subset sel limfosit tertentu secara lebih spesifik tanpa adanya pengaruh faktor fisiologis tubuh yang kompleks.
4. Perlu dilakukan isolasi dan analisis bioaktivitas senyawa aktif dalam propolis sehingga dapat diketahui pengaruh spesifik suatu senyawa terhadap perkembangan sel limfosit.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A. K. & Lichtman A. H. 2005. **Cellular and molecular immunology**. Fifth Edition. Elsevier Inc. USA.

Askenasy, N., K. Ayelet, & Shai Y. 2008. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmunity Reviews*. 7:370–375. www.elsevier.com/locate/autrev. Diakses pada tanggal 5 Desember 2014.

Bakke, A. C. 2001. The principles of flow cytometry. *Laboratory medicine*. Number 4, volume 32.

Baratawidjaja, K. G. & Iris R. 2010. **Imunologi dasar**. Edisi ke-9. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

Campbell, D.J. & Ziegler S.F. 2007. FOXP3 modified the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. 7:305–310.

Canada Agriculture and Food Museum. 2014. **The beekeeper**. http://bees.techno-science.ca/bees-shared/images/4.1.2.3.jpg. Diakses pada tanggal 15 Desember 2014.

Cheunga, K.W., Daniel M. Y. S., Wing K. C., Rui-Xia D., Wenwei T., & Godfrey C. F. C. 2011. Brazilian Green Propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. *Journal of Ethnopharmacology*. 138:463–471. www.elsevier.com/ locate/jethpharm. Diakses pada tanggal 19 Mei 2014.

Daniel, R. P. 2006. B cells as antigen presenting cells. *Review of Cellular Immunology*. 238:67–75. www.elsevier.com/ locate/ycimm. Diakses pada tanggal 5 Desember 2014.

Draganova, M. F., M. Nikolova, A. Mihova, L. Peychev & V. Sarafian. 2010. A pilot study on the immunomodulatory effect of Bulgarian Propolis. *Biotechnol & Biotechnol*. 24:119-124.

Fatahinia, M., Khosravi, A. R., & Shokri, H. 2012. Propolis efficacy on TNF-α, IFN-γ and IL-2 cytokines production in old mice with and without sistemic candidiasis. *Journal of Mycology*. *22*: 237—242. Elsevier Masson. Perancis.

Hall, C. 2010. **White blood cell counter**. Dept. of Electrical and Computer Engineering Utah State University. Utah**.**

Helsinki. 2014. **Propolis**. http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/aineistot/hyonteistenkemiaa/english/propolis_web_page.htm. Diakses pada tanggal 15 Desember 2014.

Insectexpertphd. 2010. **The Africaned Bee and Honeybee**. http://insectexpertphd.com/africanizedbees.aspx. Diakses pada tanggal 15 Desember 2014.

Ivanovska, N., Nechev H., Stefanova Z., Bankova V., & Popov S. 1995. Influence of cinammic acid on lymphatic proliferation, cytokine release and Klebsiella infection in mice. *Apidol*. 26:73—81.

Jaya, F., Radiati, L. E., Awwaly, K., U., A., & Kalsum, U. 2005. **Pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap sistem kekebalan seluler pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar.** Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.

Lee, Y. H. & Rifa'i M. 2011. $CD4^+CD25^+$ $FOXP3^+$ regulatory T cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of Tropical Life Science*. 1 (2): 69-75.

Lopes, A. A., Thiago S. F., Renata T. N., Mannuella L., Karla M. P. P., Ari M. S., Ricardo M. B.,Antonio J. R. S., Samuel S. V., & Luís C. P. 2014. *Antioxidant* action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.10.044. Diakses pada tanggal 5 Desember 2014.

Maharani, Rokim A. K., & Nunung N. 2011. **Keajaiban propolis Trigona**. Penerbit Puspa Swara. Cimanggis.

Maloy, K. J. & Fiona P. 2005. Fueling regulation: IL-2 keeps $CD4^+$ Treg cells fit. *Nature Immunology*. 6:1071 – 1072.

Marquez, N., Sancho, R., Macho, A., Calzado, M.A., Fiebich, B.L., & Mu˜noz, E. 2004. Caffeic Acid Phenethyl Ester inhibits T-cell activation by targeting both Nuclear Factor of Activated T-cells and NF-kB transcription factors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308: 993–1001.

Murai, M., Olga T., Gisen K., Rajat M., Christopher L. K., Hilde C., & Mitchell K. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. 10(11): 1178–1184.

Mustafiah, S. E., Dina, F., & Iwang Y. 2011. **Indeks daya fagosit makrofag peritoneum setelah pemberian propolis pada mencit (*Mus musculus*).** Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung. Semarang.

Nazir, N. 2014. Imunomodulatory 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.

Okamoto,Y., Takazumi H., Tatsuya E., Takashi F., & Toshiyuki M. 2014. Brazilian propolis Ameliorates Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis in mice by inhibiting Th1 differentiation. *Journal of International Immunopharmacology*. 16:178–183. www.elsevier.com/locate/intimp. Diakses pada tanggal 5 Desember 2014.

Orsolic N. 2003. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a faktor of antitumor Rractivity. *J Ethnopharmacol*. 84:265—73.

Park, J. H., Lee J. K., Kim H. S., Chung S. T., Eom J. H., & Kim K. A. 2004. Immunomodulatory effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol*. 4:429—36.

Pellati, F., Francesco P. P., & Stefania B. 2014. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. www.elsevier.com/locate/jpba. Diakses pada tanggal 5 Desember 2014.

Rifa'i, M. 2011. **Autoimun dan bioregulator.** UB Press. Malang.

Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima, & H. Suzuki. 2004. Essential roles of $CD8^{+}CD122^{+}$ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine*. 200 (9):1123-1134.

Rifa'i, M., Z. Shi, S.Y. Zhang, Y.H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, & H. Suzuki. 2008. CD8+CD12+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I–αβTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *International Immunology*. 20. 937-947

Rifai'i, M. 2010. Andrographolide ameliorate rheumatoid arthritis by promoting the development of regulatory T cells. *Journal of Tropical Life Science.* 1 (1):5-8.

Rizkita, R.E. & Anggraini B. 2011. **Respon Imun.** http://www.sithitb.com. Diakses pada tanggal 18 Desember 2011.

Robert, J. 2003. **Flowcytometry.** http://www.thescientist.com/ articles.view/ articleNo/14733/title/Flow-Cytometry/. Diakses pada tanggal 18 Desember 2014.

Sasmito, E., Nunung Y., & Soegihardjo C. J. 2007. **Mekanisme imunomodulator ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia, l.*) pada Mencit Balb/c yang diinduksi vaksin hepatitis B.** Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Sforcin, J.M., & Vassya B. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Review: Journal of Ethnopharmacology.* 133: 253–260. www.elsevier.com/locate/ jethpharm. Diakses pada tanggal 19 Mei 2014.

Silva, J. C., Sandra R., Xesús F., & Leticia M. 2011. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Journal of Food and Chemical Toxicology*. www.elsevier.com/locate/foodchemtox. Diakses pada tanggal 5 Desember 2014.

Siregar, H.C.N., Asnanth M.F., & Yuke, O. 2011. **Propolis madu multikhasiat.** Penebar Swadaya. Jakarta.

Solomon. 2003. **Biology.** Third edition. Saunders-College Publishing, Forth Worth. USA.

Suranto, A. J. 2010. **Dahsyatnya propolis untuk menggempur penyakit.** PT Agromedia Pustaka. Jakarta

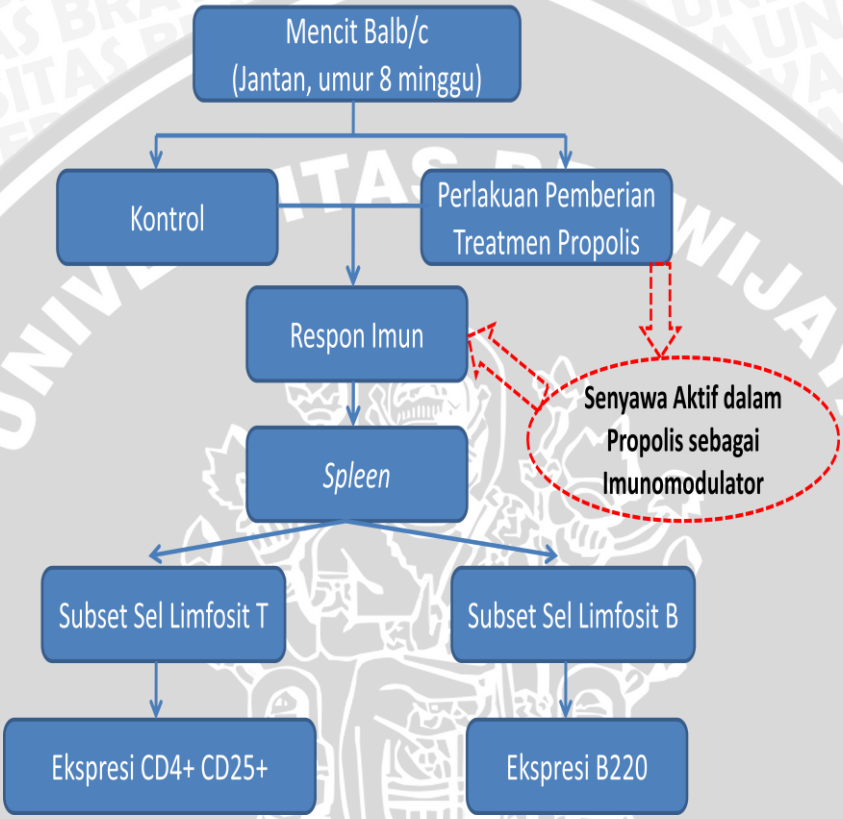
Taebe B., Elisabet A. R., Marianti A. M., & Usmar. 2012. Uji efek hipoglikemik kombinasi ekstrak etanol propolis dan ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens Merr & Perry*) pada mencit (*Mus musculus*). *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 16:151 – 158.

Takagi, Y., Choi, I., Yamashita, T., Nakamura, T., Suzuki, I., hasegawa, T., Oshima, M., & Gu Y. 2005. Immune activation and radioprotection by propolis. Institute For Advance Research in Asian Science and Medicine. *The American Journal of Chinese Medicine.* 33(3): 231-240.

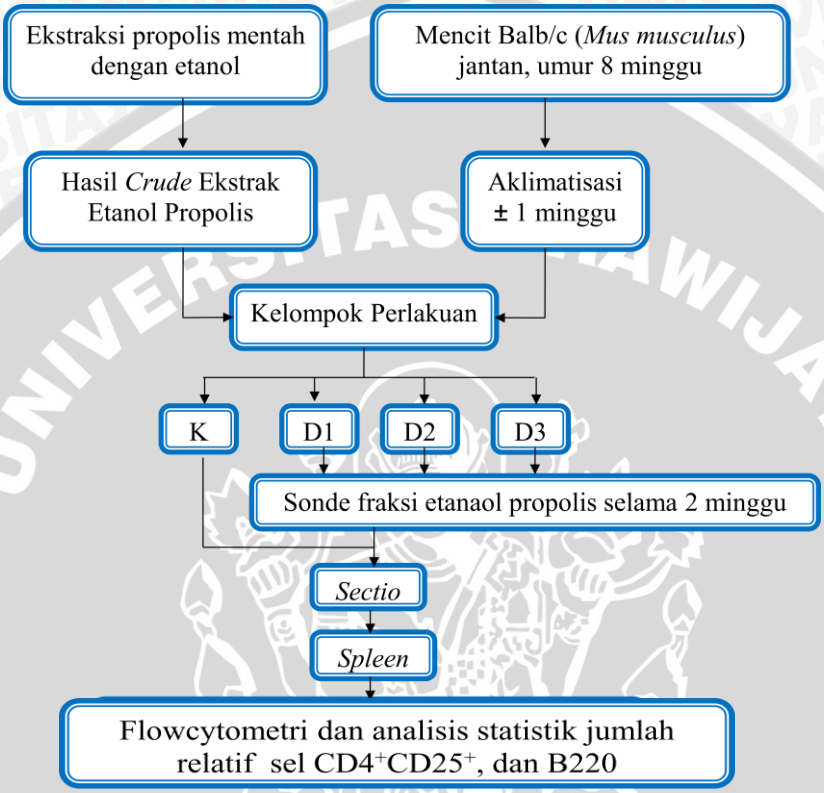
Trzonkowski, P., Magdalena S., Jolanta M. T., & Andrzej M.T. 2009. Ex vivo expansion of CD41CD251 T regulatory cells for immunosuppressive therapy. 2009. *Review Article: Journal Of International Society for Advancement of Cytometry*. Part A. 75A: 175-188.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Konsep Penelitian



Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian



Lampiran 3. Jadwal Penelitian.

No.	Kegiatan	September-2013	Oktober-2013	November-2013	Desember-2013	Januari-2014	April-2014	Mei-2014	Juni-2104
1	Penyusunan kerangka konsep dan operasional penelitian								
2	Aklimatisasi hewan coba mencit Balb/c								
3	Penyiapan propolis								
4	Ekstraksi propolis								
5	Uji *in vivo*								
6	Flowcitometri hasil uji *in vivo*								
7	Pengambilan data flowcitometri								
8	Penyusunan proposal								
9	Seminar proposal penelitian								
10	Analisis data flowcitometri dengan software BD Cell QuestPro								
11	Analisis statistik data jumlah relatif sel								
12	Penyusunan laporan penelitian								
12	Seminar hasil penelitian								
13	Ujian sidang Comprehensif								

Lampiran 4. Hasil analisis ragam, Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$

Tabel LT 4.1 Hasil uji normalitas jumlah relatif sel T $CD4^+CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RELCD425THD4
N		24
Normal Parameters[a,,b]	Mean	6.7067
	Std. Deviation	1.19397
Most Extreme Differences	Absolute	.139
	Positive	.134
	Negative	-.139
Kolmogorov-Smirnov Z		.683
Asymp. Sig. (2-tailed)		.739

a. Test distribution is Normal.

Tabel LT 4.2 Hasil uji homogenitas jumlah relatif sel T $CD4^+$ $CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$

Test of Homogeneity of Variances

RELCD425THD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.966	3	20	.010

Tabel LT 4.3 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T $CD4^+$ $CD25^+$ terhadap populasi sel $CD4^+$

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank
RELCD425THD4	KONTROL	6	3.50
	D1	6	13.00
	D2	6	12.50
	D3	6	21.00
	Total	24	

Test Statistics[a,b]

	RELCD425THD4
Chi-Square	18.420
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 4.3.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D1

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELCD425THD4	KONTROL	6	3.50	21.00
	D1	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELCD425THD4
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 4.3.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D2

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELCD425THD4	KONTROL	6	3.50	21.00
	D2	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELCD425THD4
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 4.3.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELCD425THD4	KONTROL	6	3.50	21.00
	D3	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELCD425THD4
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 4.3.4 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D2

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELCD425THD4	D1	6	6.50	39.00
	D2	6	6.50	39.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELCD425THD4
Mannn-Whitney U	18.000
Wilcoxon W	39.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 4.3.5 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELCD425THD4	D1	6	4.00	24.00
	D3	6	9.00	54.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELCD425THD4
Mannn-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 4.3.6 Uji Mann Whitney antara kelompok D2-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELCD425THD4	D2	6	3.50	21.00
	D3	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELCD425THD4
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 5. Hasil analisis ragam, Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel T $CD4^{+}CD25^{+}$terhadap sel limfosit

Tabel LT 5.1 Hasil uji normalitas jumlah relatif sel T $CD4^{+}CD25^{+}$terhadap sel limfosit

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		REL425THDLIM
N		24
Normal Parameters[a,,b]	Mean	.8018
	Std. Deviation	.18877
Most Extreme Differences	Absolute	.276
	Positive	.152
	Negative	-.276
Kolmogorov-Smirnov Z		1.352
Asymp. Sig. (2-tailed)		.052

a. Test distribution is Normal.

Tabel LT 5.2 Hasil uji homogenitas jumlah relatif sel T $CD4^{+}$ $CD25^{+}$ terhadap populasi sel limfosit

Test of Homogeneity of Variances

REL425THDLIM

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.684	3	20	.000

Tabel LT 5.3 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel T $CD4^+$ $CD25^+$ terhadap populasi sel limfosit

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank
REL425THDLIM	KONTROL	6	18.50
	D1	6	18.50
	D2	6	9.50
	D3	6	3.50
	Total	24	

Test Statistics[a,b]

	REL425THDLIM
Chi-Square	19.448
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 5.3.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D1

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
REL425THDLIM	KONTROL	6	6.50	39.00
	D1	6	6.50	39.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	REL425THDLIM
Mannn-Whitney U	18.000
Wilcoxon W	39.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 5.3.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D2

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
REL425THDLIM	KONTROL	6	9.50	57.00
	D2	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	REL425THDLIM
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 5.3.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
REL425THDLIM	KONTROL	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	REL425THDLIM
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 5.3.4 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D2

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
REL425THDLIM	D1	6	9.50	57.00
	D2	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	REL425THDLIM
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 5.3.5 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
REL425THDLIM	D1	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	REL425THDLIM
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 5.3.6 Uji Mann Whitney antara kelompok D2-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
REL425THDLIM	D2	6	9.50	57.00
	D3	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	REL425THDLIM
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 6. Hasil analisis ragam, Kruskal Wallis dan Mann Whitney jumlah relatif sel B220

Tabel LT 6.1 Hasil uji normalitas jumlah relatif sel B220

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RELB220
N		24
Normal Parameters[a,,b]	Mean	56.0103
	Std. Deviation	4.49594
Most Extreme Differences	Absolute	.263
	Positive	.164
	Negative	-.263
Kolmogorov-Smirnov Z		1.289
Asymp. Sig. (2-tailed)		.072

a. Test distribution is Normal.

Tabel LT 6.2 Hasil uji homogenitas jumlah relatif B220

Test of Homogeneity of Variances

RELB220

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.538	3	20	.014

Tabel LT 6.3 Uji Kruskal Wallis jumlah relatif sel B220

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank
RELB220	KONTROL	6	9.50
	D1	6	17.50
	D2	6	3.50
	D3	6	19.50
	Total	24	

Test Statistics[a,b]

	RELB220
Chi-Square	19.680
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 6.3.1 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D1

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELB220	KONTROL	6	3.50	21.00
	D1	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELB220
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 6.3.2 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D2

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELB220	KONTROL	6	9.50	57.00
	D2	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELB220
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 6.3.3 Uji Mann Whitney antara kelompok kontrol-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELB220	KONTROL	6	3.50	21.00
	D3	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELB220
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 6.3.4 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D2

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELB220	D1	6	9.50	57.00
	D2	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELB220
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 6.3.5 Uji Mann Whitney antara kelompok D1-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELB220	D1	6	5.50	33.00
	D3	6	7.50	45.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELB220
Mannn-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Tabel LT 6.3.6 Uji Mann Whitney antara kelompok D2-D3

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RELB220	D2	6	3.50	21.00
	D3	6	9.50	57.00
	Total	12		

Test Statistics[b]

	RELB220
Mannn-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN