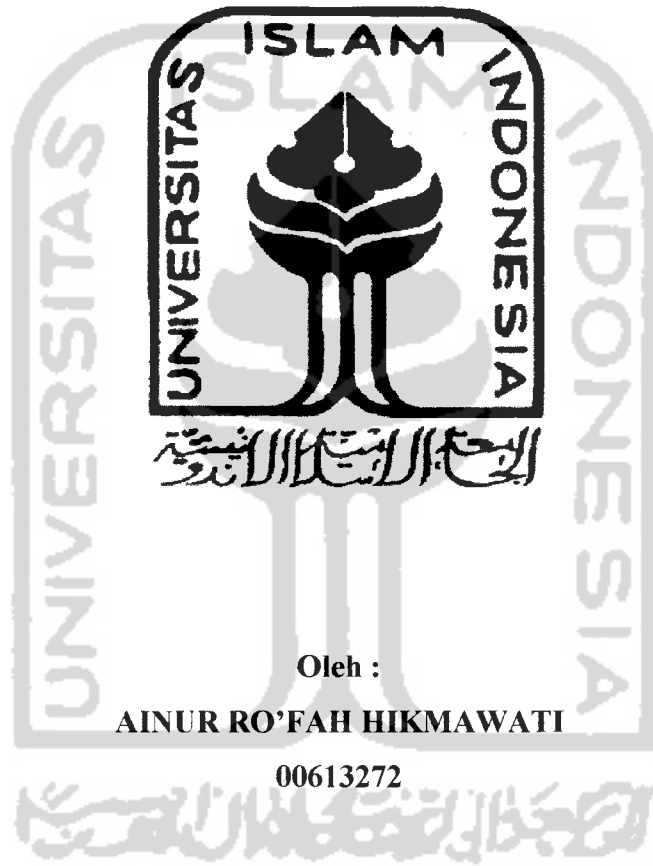


DIREKTORAT PERPUSTAKAAN UII
INVENTARIS SIMBANGAN
TANGGAL: / /
NO. INV. :

**UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN JUS KACANG HIJAU
MENGUNAKAN METODE UJI MTT-REDUCTION
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI



Oleh :
AINUR RO'FAH HIKMAWATI

00613272

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA**

JOGJAKARTA

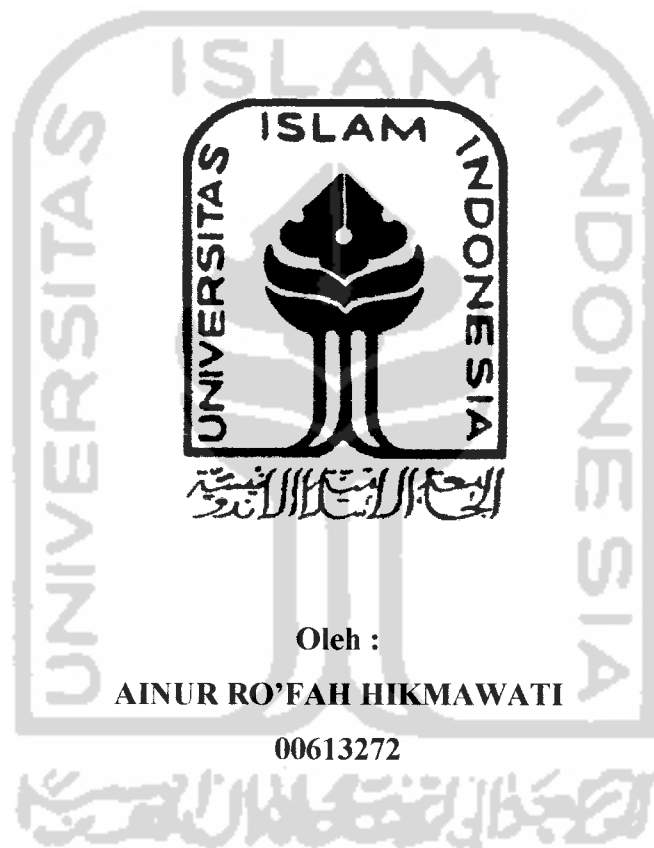
JULI 2004



**UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN JUS KACANG HIJAU
MENGUNAKAN METODE UJI MTT-REDUCTION SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia Jogjakarta**



Oleh :

AINUR RO'FAH HIKMAWATI

00613272

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
JULI 2004**

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN JUS KACANG HIJAU
MENGUNAKAN METODE UJI MTT-REDUCTION SECARA
IN VITRO**

Yang diajukan oleh :

AINUR RO'FAH HIKMAWATI

00613272

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Dr. Ediati Sasmito, Apt.

Pembimbing Pendamping,



Sri Mulyaningsih, M.si.,Apt.

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN JUS KACANG HIJAU MENGUNAKAN METODE UJI MTT-REDUCTION SECARA *IN VITRO*

Oleh :

AINUR RO'FAH HIKMAWATI

00613272

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 23 Juli 2004

Ketua Penguji


Dr. Ediat Sasmito, Apt

Anggota penguji,

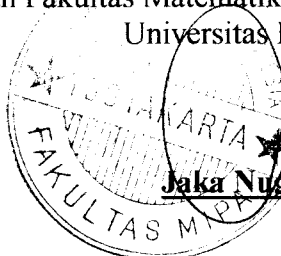

Sri Mulyaningsih, M.Si., Apt

Anggota penguji,


Prof. Dr. Sasmito, Apt

Mengetahui
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia


Jaka Nugraha, M.Si.



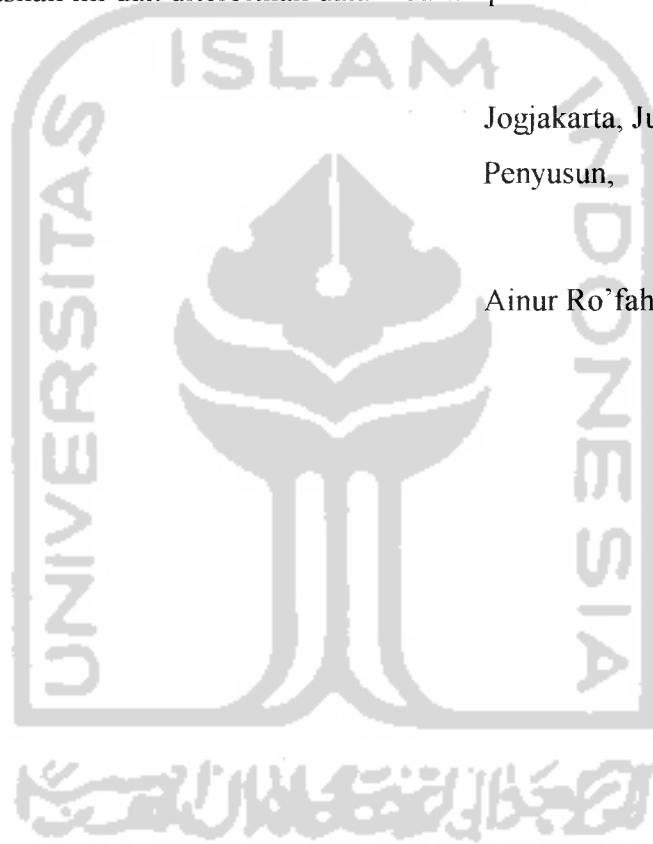
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Jogjakarta, Juli 2004

Penyusun,

Ainur Ro'fah Hikmawati



*“sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan,
maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan)
kerjakanlah dengan sungguh-sungguh urusan yang lain,
Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap”
(Qs. Al an’am : 162)*

telah kusadari bahwa seorang sahabat adalah
karunia tersuci dari Tuhan
karena persahabatan adalah cinta tanpa pamrih
(Kahlil Gibran)

ketika kumohon pada Allah kekuatan
Allah memberiku kesulitan agar aku menjadi kuat
ketika kumohon pada Allah kebijaksanaan
Allah memberiku masalah untuk dipecahkan
ketika kumohon pada Allah keberanian
Allah memberiku kondisi bahaya untuk kuatasi
ketika kumohon pada Allah kesejahteraan
Allah memberiku akal untuk berfikir
ketika kumohon pada Allah bantuan
Allah menghadirkan padaku kesempatan
ketika kumohon pada Allah untuk sebuah cinta
Allah memberiku orang-orang bermasalah untuk kutolong

*Aku tak pernah menerima apa yang kupinta
Tapi aku menerima apa yang kubutuhkan
DOAKU TERJAWAB SUDAH.....*

DENGAN SEGENAP KESYUKURAN KUPERSEMBAHKAN KARYA
KECILKU INI PADAMU YA RABBI MAHA DARI SEGALANYA DAN
SHALAWAT UNTUK RASULULLAH SAW SEBAGAI SURJI TAUHADAN
DAN JUGA ORANG-ORANG TERKASIHKU:

Orangtuaku tercinta abah (H Abdul Wahid) dan bu'e (Hj Robiah)....sebagai
ungkapan rasa hormat dan baktiku, atas tiap tetes keringat dan airmata yang
mereka kucurkan, atas tiap bisikan doa yang tiada putusnya yang selalu
mengiringi setiap langkahku, juga perhatian dan kasih sayangnya untukku

My brothers : mas arif, M.Ag, mas aris, S.Tp, dan calon kakak2 iparku (tambah
satoe sarjana lagi ni di rumah) dik mujib, dik ilham (yang rajin ya...jangan suka
ngambek) ...makasih selalu memberikan semangat, perhatian dan kasih sayangnya
untukku

Keluarga besar HAKAM di Pasir dan BANI BAILOWIE SIROJ di Kajen....
yang telah memberikan 'apa arti persaudaraan' dan 'arti hidup' di lingkungan
keluarga yang sangat banyak saudara...

My best friend Fajar Novianharti...makasih untuk persahabatannya,
semangatnya, perhatiannya, kasih sayangnya...impian tuax wisuda bareng
terkabil juga nich...sungkemku buat Bapak-Ibumu

SPECIAL THANK'S To:

- **fajar novianharti, mohamad norhadi, eko widyanto...** terimakasih untuk kebersamaan kita selama mengerjakan skripsi dan saat penelitian, tak akan kulupa selamanya 'n jangan lupa klo dah jadi orang...ocreee
- **anak-anak kost: ino'** (makasih prjnternya, ngeditnya, jadilah ino' yang dulu pertama kkenal...kpn nyusul), **kak era** (skrg gta sama nih, jgn main trus), **erlin** (kpn nyusul), **mami** (terbuka ya.. ma mbar nya), **tinul** (ingat ma umur...)... makasih untuk dorongan semangat, kebersamaan dan kekeluargaan kita selama hidup di jogja, moga akan tetap terjalin tali silaturahmi meski sudah saling berjanjian.
- **ga, ffi, piet, aini, yuli, noy, uul, nizng...** makasih untuk persahabatan kita selama kuliah, moga akan tetap langgeng sampai akhir hayat... kpn nyusul!
- **teman2 KKN SL 50 Angk. 27 dan keluarga besar Bpk Ngadiono...** makasih untuk kekeluargaan kita selama KKN... yang penting kompak yah ...
- **keluarga besar Bpk Sunoto, Ibu, Rina, Retno, de irma, Jeni...** makasih untuk kekeluargaannya, dan nganggep kayak anak sendiri...sampe ga pindah2 nih..
- **ida, mb neli, de ifa, mb hid, de faza, dzir...** tambah satu nih pengacarannya hehe...
- **sobat lamakoe: Desy...** makasih untuk perhatian, supportnya meski dah 4th ga ketemu tp tetep aja merhatin...kangen nich
- **konco2ku di pasir: ida, afid** (bentar lg jd tante nih), **yanis, ari, dipto, said n istri, nang birin, mb iir, cimin, de ifa...** kpn reuni lg? Kangen nih.....
- **teman2 Farmasi UII angkatan 2000...** yang telah memberi warna di duniaku
- **tetangga kosku...** yang telah memberi warna dlm duniaku, meski jarang ngobrol tp aku tau kalian baik koq dan perhatian
- **guruku dan Almamaterku:** SDN3 Pasir, MTs Al-hikmah Pasir, SMUN I Demak, Farmasi UII, Madin Al-hikmah dan Madin Al-fattah
- **komputerku...** untuk kesabaranmu karena tak maki2 terus kalo aku lagi ga bisa
- **tiriku...** untuk kesetiaanmu menemaniiku saat aku gi BeTe (butuh kontonan)
- **motorku...** yang selalu menemani kemanapun aku pergi

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Puji syukur kupanjatkan kehadirat Allah SWT, atas segala rahmat, anugerah dan hidayah-Nya, Sholawat serta salam untuk Nabi Muhammad SAW dan keluarganya, sehingga penyusun dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN JUS KACANG HIJAU MENGGUNAKAN METODE MTT REDUCTION SECARA IN VITRO. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi syarat kurikulum akhir untuk memperoleh gelar Sarjana Strata 1 pada jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas IslamIndonesia.

Terselesainya skripsi ini tidak lepas dari bantuan beberapa pihak yang telah memberikan bimbingan dan saran-saran yang berguna untuk penyusunan skripsi ini, untuk itu penyusun mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Ibu Dr.Ediati Sasmito, Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan banyak waktu dalam bimbingan, memberikan petunjuk dan nasehat-nasehat.
2. Ibu Sri Mulyaningsih, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan banyak waktu dalam bimbingan, memberikan petunjuk, nasehat dan masukan-masukan.
3. Bapak Prof. Sasmito, Apt selaku dosen penguji.
4. Ibu Farida Hayati, M.Si. ,Apt selaku ketua Jurusan Farmasi.
5. Bapak Jaka Nugraha, M.Si. selaku dekan F-MIPA.
6. Ibu Istini selaku laboran di Laboratorium Hayati yang banyak membantu dalam penelitian.
7. Seluruh Staff Laboratorium Farmasi Universitas Islam Indonesia.
8. Seluruh Staff Laboratorium Ilmu Hayati UGM.
9. Seluruh Staff perpustakaan F-MIPA Universitas Islam Indonesia.
10. Seluruh Staff perpustakaan Fakultas Farmasi UGM.

11. Serta semua pihak yang telah banyak membantu yang tidak dapat penyusun sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penyusun panjatkan kehadiran Allah SWT dengan harapan semoga tulisan ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang Farmasi. Namun penyusun menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu penyusun membuka diri untuk segala saran yang diberikan.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb.

Jogjakarta, Juli 2004

Penyusun

Ainur Ro'fah Hikmawati



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
INTISARI.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
BAB II. STUDI PUSTAKA	
A. Tinjauan Pustaka.....	5
1. Kacang Hijau.....	5
2. Sistem Imunitas Tubuh.....	7
3. Organ Limfoid.....	18
4. Kultur Sel.....	19
5. ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assays).....	19
6. MTT <i>Reduction</i>	22
B. Keterangan Empiris.....	22

BAB III. METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat.....	23
B. Cara Penelitian.....	24
1. Pengumpulan Bahan.....	24
2. Determinasi Tanaman.....	24
3. Sterilisasi Alat.....	24
4. Pembuatan Larutan Stok Jus Kacang Hijau.....	24
5. Isolasi Limfosit.....	24
6. Uji Immunostimulan dengan MTT	25
7. Uji produksi antibodi dengan ELISA tidak langsung.....	26
C. Analisis Hasil.....	28

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pembuatan Jus Kacang Hijau.....	30
B. Isolasi dan Kultur Sel Limfosit dari Limpa Mencit.....	30
C. Pengukuran proliferasi limfosit dengan MTT reduction.....	31
D. Pengukuran Produksi Antibodi dengan ELISA.....	38
E. Penghitungan Sel dengan Mikroskop.....	44

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

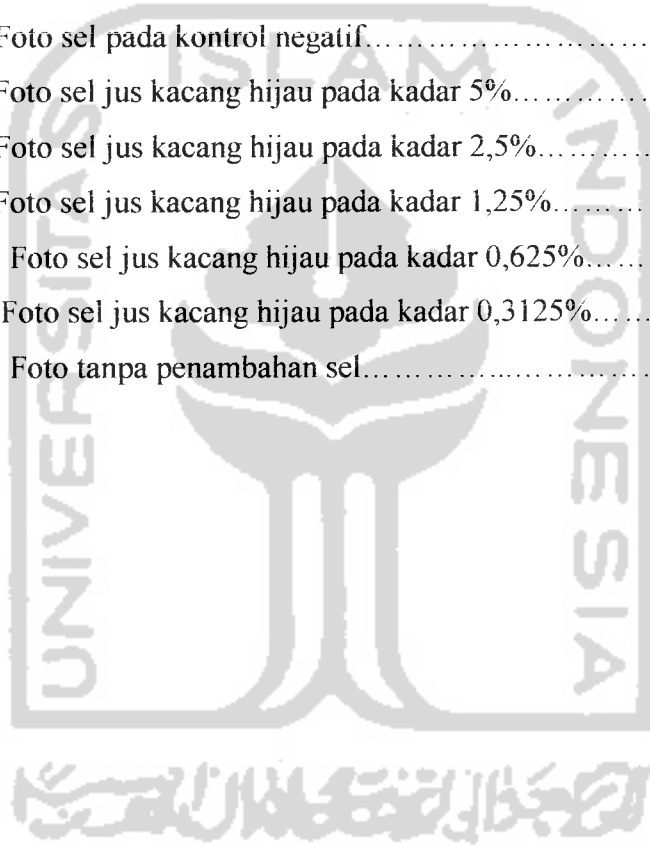
A. Kesimpulan	49
B. Saran.....	49

DAFTAR PUSTAKA.....	50
---------------------	----

LAMPIRAN.....	52
---------------	----

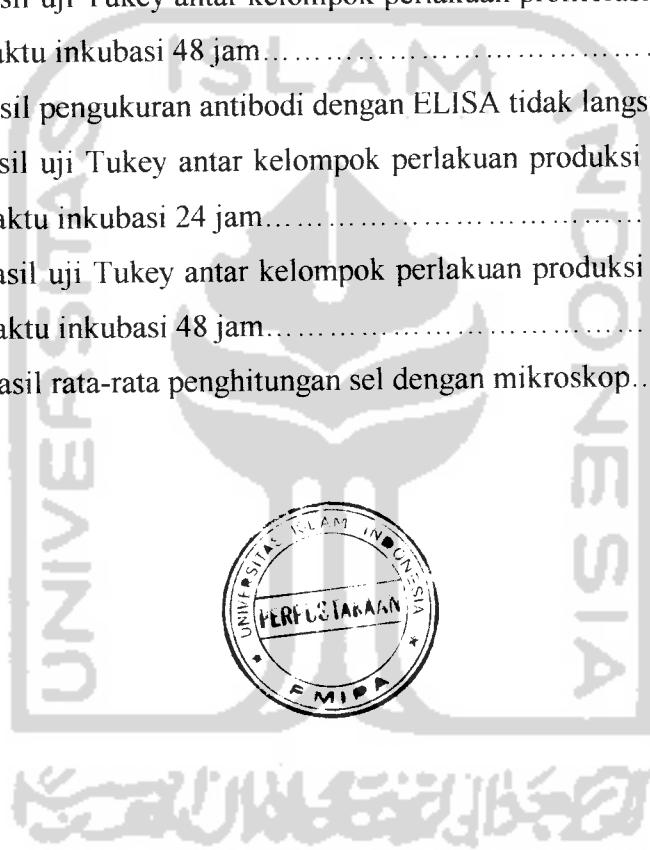
DAFTAR GAMBAR

1. Gambar 1. Foto kacanghijau.....	6
2. Gambar 2. Sistem imun.....	9
3. Gambar 3. Konfigurasi ELISA tidak langsung.....	21
4. Gambar 4. Skema cara penelitian uji imunostimulan dengan MTT.....	27
5. Gambar 5. Foto sel pada kontrol positif.....	45
6. Gambar 6. Foto sel pada kontrol negatif.....	45
7. Gambar 7. Foto sel jus kacang hijau pada kadar 5%.....	46
8. Gambar 8. Foto sel jus kacang hijau pada kadar 2,5%.....	46
9. Gambar 9. Foto sel jus kacang hijau pada kadar 1,25%.....	47
10. Gambar 10. Foto sel jus kacang hijau pada kadar 0,625%.....	47
11. Gambar 11. Foto sel jus kacang hijau pada kadar 0,3125%.....	48
12. Gambar 12. Foto tanpa penambahan sel.....	48



DAFTAR TABEL

1. Tabel I. Hasil pengukuran proliferasi limfosit dengan MTT *reduction*.....33
2. Tabel II. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan proliferasi limfosit dengan waktu inkubasi 24 jam.....35
3. Tabel III. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan proliferasi limfosit dengan waktu inkubasi 48 jam.....37
4. Tabel IV. Hasil pengukuran antibodi dengan ELISA tidak langsung.....40
5. Tabel V. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan produksi antibodi dengan waktu inkubasi 24 jam.....42
6. Tabel VI. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan produksi antibodi dengan waktu inkubasi 48 jam.....43
7. Tabel VII. Hasil rata-rata penghitungan sel dengan mikroskop.....44



DAFTAR LAMPIRAN

1. Penghitungan jus kacang hijau yang akan dimasukkan ke plate.....	52
2. Penghitungan limfosit.....	53
3. Penghitungan dosis levamisol.....	54
4. Komposisi larutan untuk ELISA.....	55
5. Untuk kultur sel.....	56
6. Tabel statistik pengukuran proliferasi limfosit pada inkubasi 24 jam.....	57
7. Tabel statistik pengukuran proliferasi limfosit pada inkubasi 48 jam.....	61
8. Tabel statistik pengukuran produksi antibodi pada inkubasi 24 jam.....	65
9. Tabel statistik pengukuran produksi antibodi pada inkubasi 48 jam.....	69
10. Foto inkubator CO ₂	73
11. Foto <i>inverted mikroskop</i>	74
12. Foto ELISA <i>reader</i>	75
13. Foto inkubator suhu kamar.....	76
14. Foto pate setelah diberi OPD.....	77

UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN JUS KACANG HIJAU MENGUNAKAN METODE UJI MTT-*REDUCTION* SECARA *IN VITRO*

INTISARI

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan jus kacang hijau apakah mempunyai aktivitas imunostimulan terhadap peningkatan proliferasi sel limfosit dan produksi antibodi, yang dilakukan pada limpa mencit secara *in vitro* menggunakan metode MTT *Reduction*. Kacang hijau merupakan biji-bijian yang kaya akan protein sehingga diduga mempunyai aktivitas imunostimulan. Uji dilakukan pada 8 kelompok kultur sel limfosit yang diisolasi dari limpa mencit, dengan vaksin hepatitis A sebagai antigen. Pada masing-masing kelompok, kelompok I, II, III, IV dan V ditambahkan jus kacang hijau dengan kadar beturut-turut 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625% dan 0,3125%. Kelompok VI ditambahkan larutan RPMI sebagai kontrol negatif. Kelompok VII ditambahkan levamisol sebagai kontrol positif dan kelompok VIII tanpa penambahan sel. Sebagai parameternya adalah peningkatan proliferasi limfosit dan produksi antibodi yang dihasilkannya. Data absorbansi yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode ANAVA satu jalan dengan tingkat kepercayaan 95%, jika ada perbedaan yang signifikan dilanjutkan uji Tukey. Hasil kadar yang optimal adalah 0,625% karena pada kadar tersebut mampu meningkatkan proliferasi sel dan produksi antibodi.

Kata kunci : jus kacang hijau, imunostimulan, MTT.

THE INVITRO IMMUNOSTIMULANT ACTIVITY TEST OF GREEN PEANUT JUICE USING MTT REDUCTION METHOD

ABSTRACT

Intention of this research is to know the influence using of juice green peanut of whether having activity immunostimulant to improvement of proliferation of cell limfosit and produce the antibody, what is done at spleen mencil by in vitro use the method of MTT reduction. Green peanut represent the rich bulk of protein will so that anticipated to have the activity immunostimulant. Test done at 8 group of culture of cell limfosit which insulation from spleen mencil, with the vaccine of hepatitis A as antigen. At each group, group I, II, III, IV, and V enhanced by juice green penut with the rate successively 5%, 2,5%, 1,25%,0,625% and 0,3125%. Group VI enhanced condensation RPMI as negative control. Group VII enhanced levamisol as positive control and groupVIII without cell addition. As it's parameter is improvement of proliferation limfosit and produce the antibody yielded. Data absorban obtained to be analysed statistically by using one track method ANAVA with the belief level 95%, if there is difference which significant continued to test Tukey. The result optimal rate is 0,625% because mentioned rate capable to improve proliferation of cell limfosit and produce the antibody.

Keyword : green peanut juice, immunostimulant, MTT.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Aktivitas manusia yang begitu *mobile*, mengharuskan manusia untuk selalu berhubungan, secara sengaja ataupun tidak disengaja dengan apa yang ada di sekitarnya. Dimana, lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, misalnya bakteri, virus, fungi, protozoa dan parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Dan setiap orang dihadapkan pada berbagai jenis mikroba di sekitarnya yang setiap saat siap untuk menyerang, tetapi setiap saat tubuh berupaya untuk mempertahankan diri (Kresno, 2001).

Sistem imun melindungi tubuh terhadap invasi zat atau benda asing, benda asing itu bervariasi mulai dari mikroorganisme sampai tepung sari rumput atau tanaman tertentu dan mulai dari organ yang ditransplantasikan sampai protein autolog yang mengalami sedikit perubahan (Widmann, 1995). Manusia dan hewan mempunyai sistem pelacakan dan penjagaan terhadap benda asing yang dikenal dengan sistem imun, dimana dapat melindungi tubuh terhadap penyebab penyakit patogen seperti virus, bakteri, parasit, jamur. Sistem imun terbagi menjadi dua yaitu imun non spesifik dan sistem imun spesifik (Rantam, 2003).

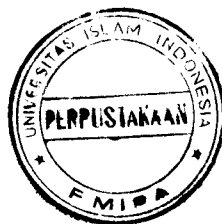
Tidak sedikit penyakit timbul yang diakibatkan melemahnya sistem imun dalam melawan serangan berbagai zat asing atau penyakit. Hal ini salah satunya mungkin disebabkan karena kurangnya atau lambatnya tubuh dalam memproduksi

hijau mengandung vitamin (terutama vitamin B₁), protein, lemak, dan karbohidrat (Soeprapto, 2004).

Kacang hijau juga diyakini dapat digunakan untuk menyembuhkan penyakit AIDS, dimana pengolahannya yaitu kacang hijau dimasak dengan ketela rambat lalu diberi gula hingga masak kemudian dimakan. Hal ini diyakini dapat meningkatkan kekebalan tubuh dari gangguan penyakit (Anonim, 2004^a).

Kacang hijau juga bisa menurunkan demam, bahkan menurut hasil penelitian, kacang hijau adalah penurun demam yang terbaik bila dibandingkan dengan penurun demam dari ramuan tradisional lainnya. Hebatnya lagi, biar direbus lama, sampai hancur, kacang hijau tetap berkhasiat, tidak terpengaruh dengan panas. Berbeda dengan kacang, sayur, buah, dan bahan ramuan tradisional lainnya yang bila direbus terlalu lama, akan menurunkan khasiat pengobatannya (Anonim, 2004^b).

Untuk itu dilakukan penelitian dengan tujuan menguji adanya kemampuan kacang hijau dalam meningkatkan imunitas. Salah satu caranya adalah dengan cara mengamati pengaruhnya terhadap imunoglobulin (produksi antibodi). IgG merupakan 75 % dari imunoglobulin total yaitu merupakan imunoglobulin utama yang dibentuk atas rangsangan antigen (Kresno, 2001). IgG berperan dalam menangkal penyebaran bakteri dan virus, menetralkan toksin bakteri, mengaktifkan sistem komplemen, dan meningkatkan efektivitas sel fagosit (Case et al, 2001).



Selain itu juga dilakukan pengamatan terhadap jumlah limfositnya, seperti yang diketahui jika suatu jaringan atau sel terpapar oleh antigen yang tepat, maka limfosit dari jaringan limfoid akan berproliferasi dan akan melepaskan banyak sel T yang teraktivasi bersamaan antibodi. Hasil penelitian ini diharapkan bisa menjadi salah satu landasan ilmiah pemanfaatan kacang hijau dalam peningkatan imunitas tubuh.

B. Perumusan Masalah

Apakah jus kacang hijau dengan menggunakan uji MTT *reduction* secara *in vitro* mempunyai aktivitas imunostimulan ?

C. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui bahwa jus kacang hijau mempunyai aktivitas imunostimulan dengan menggunakan metode MTT *reduction* secara *in vitro*.

BAB II

STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Uraian tentang kacang hijau

1.1. Jenis tanaman

Berdasarkan kasifikasinya, kacang hijau termasuk:

Divisi	: Spermatophyta
Sub-divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Rosales
Famili	: Papilionaceae
Genus	: Vigna
Spesies	: <i>Vigna radiata</i> atau <i>Phaseolus radiatus</i>

(Soeprpto, 2004).

1.2. Pengenalan tanaman kacang hijau

Tanaman kacang hijau merupakan salah satu tanaman semusim berumur pendek (± 60 hari). Tanaman ini disebut juga *mungbean*, *green gram* atau *golden gram*.

Tanaman kacang hijau berbatang tegak dengan ketinggian sangat bervariasi, antara 30-60 cm, tergantung varietasnya. Cabangnya menyamping pada

batang utama, berbentuk bulat, dan berbulu. Warna batang dan cabangnya ada yang hijau ada juga yang ungu (Soeprapto, 2004).

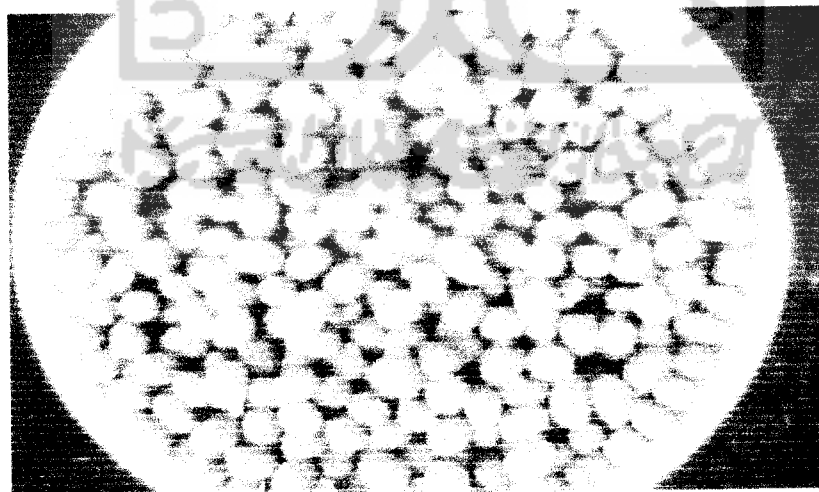
1.3. Kandungan kimia

Secara garis besar kandungan kimia dari kacang hijau yaitu protein, lemak, vitamin, mineral dan karbohidrat.

Secara rinci nilai gizi biji kacang hijau tiap 100 gram :

Nilai gizi	Biji
Kalori (kal)	345
Protein (g)	22,2
Lemak (g)	1,2
Karbohidrat (g)	62,9
Kalsium (mg)	125
Fosfor (mg)	320
Besi(mg)	6,7
Vitamin A (IU)	157
Vitamin B1 (mg)	0,64
Vitamin C (mg)	6
Air (g)	10

(Soeprapto, 2004).



Gambar 1. Foto kacang hijau

2. Sistem imunitas tubuh

Lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, misalnya bakteri, virus, fungus, protozoa dan parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi yang terjadi pada orang normal umumnya singkat dan jarang meninggalkan kerusakan permanen. Hal ini disebabkan tubuh manusia memiliki suatu sistem yang disebut sistem imun yang memberikan respon melindungi tubuh terhadap unsur patogen tersebut (Kresno, 2001).

Respon imun sangat bergantung pada kemampuan sistem imun untuk mengenali molekul asing (antigen) yang terdapat pada patogen potensial dan kemudian membangkitkan reaksi yang tepat untuk menyingkirkan sumber antigen yang bersangkutan. Proses pengenalan antigen dilakukan oleh unsur sistem imun yaitu limfosit yang kemudian diikuti oleh fase efektor yang melibatkan berbagai jenis sel. Pengenalan antigen sangat penting dalam fungsi sistem normal, karena limfosit harus mengenal semua antigen pada patogen potensial dan pada saat yang sama ia harus mengabaikan molekul-molekul jaringan tubuh sendiri (toleransi). Untuk mengatasi hal itu, limfosit pada seorang individu melakukan diversifikasi selama perkembangannya demikian rupa sehingga populasi limfosit secara keseluruhan mampu mengenal molekul asing dan membedakannya dari molekul jaringan atau sel tubuh sendiri (Kresno, 2001).

Kemampuan diversifikasi dimiliki oleh komponen-komponen sistem imun yang terdapat dalam jaringan limforetikular yang letaknya tersebar di seluruh tubuh, misalnya di dalam sumsum tulang, kelenjar limfe, limpa, *thymus*, sistem saluran nafas, saluran cerna dan organ-organ lain. Sel-sel yang terdapat dalam

jaringan ini berasal dari sel induk (*stem cell*) dalam sumsum tulang yang berdiferensiasi menjadi berbagai sel, kemudian beredar dalam tubuh melalui darah, getah bening serta jaringan limfoid, dan dapat menunjukkan respon terhadap suatu rangsangan sesuai dengan sifat dan fungsinya masing-masing. Rangsangan terhadap sel-sel tersebut terjadi apabila ke dalam tubuh masuk suatu zat yang oleh sel atau jaringan tadi dianggap asing (Kresno, 2001).

Bila sistem imun terpapar pada zat yang dianggap asing, maka ada dua jenis respon imun yang mungkin terjadi, yaitu :

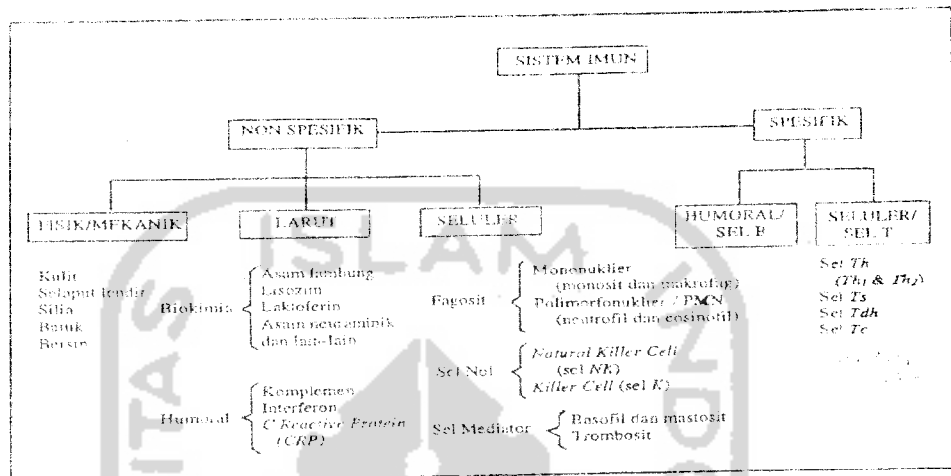
a. Respon imun non spesifik

Umumnya merupakan imunitas bawaan (*innate immunity*) dalam arti bahwa respon terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh tidak pernah terpapar pada zat tersebut.

b. Respon imun spesifik

Merupakan respon didapat (*acquired*) yang timbul terhadap antigen tertentu, terhadap mana tubuh pernah terpapar sebelumnya. Respon imun spesifik dibagi dalam 3 golongan, walaupun pada hakekatnya respon imun spesifik merupakan interaksi antara berbagai komplemen dalam sistem imun secara bersama-sama. Yaitu : 1) Respon imun selular yaitu dilaksanakan oleh limfosit T untuk melawan mikroorganisme intraselular. 2) respon imun humoral yaitu dilaksanakan oleh sel B (limfosit B) dan produknya, yaitu antibodi, dan berfungsi dalam pertahanan terhadap mikroba ekstraselular. 3) Interaksi antara respon imun selular dengan respon imun humoral, contohnya interaksi yang

disebut *antibody dependent cell mediated cytotoxicity* (ADCC). Sitolisis baru terjadi bila dibantu oleh antibodi (Kresno, 2001).



Gambar 2. Sistem imun

(Baratawidjaja, 2000).

2.1. Sel-sel imunoreaktif

Sel-sel yang bertanggung jawab atas terjadinya reaksi imunologis adalah makrofag dan limfosit. Walaupun kedua jenis sel itu berasal dari sel-sel induk (*stem cells*) dalam sumsum tulang, sebagian besar makrofag dan limfosit berkembang biak di jaringan perifer. Setiap jenis sel, masing-masing mempunyai sifat dan fungsi yang penting, baik sifat dan fungsi fisiologis maupun sifat dan fungsi diagnostik (Widmann, 1995).

Limfosit mengalami perubahan-perubahan yang jelas apabila perubahan-perubahan itu adalah :

a. Transformasi blast dan proliferasi

Sebelum stimulasi oleh antigen, limfosit berada dalam keadaan istirahat atau fase G_0 siklus sel. Setelah distimulasi, sel-sel itu akan masuk dalam fase G_1 siklus sel. Bentuknya menjadi lebih besar (limfoblast) dan mengandung RNA lebih banyak (fase sintesis, S) dan kemudian membelah. Sekuen peristiwa tersebut transformasi blast.

b. Diferensiasi menjadi sel efektor

Limfosit yang teraktivasi berdiferensiasi dari sel kognitif yang mengenal antigen menjadi sel efektor yang berfungsi menyingkirkan antigen. Limfosit B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi.

c. Diferensiasi menjadi sel memori

Sebagian populasi sel T dan sel B distimulasi tidak berdiferensiasi menjadi sel efektor tetapi menjadi sel memori yang memiliki ketahanan hidup lebih panjang, mungkin 20 tahun atau lebih bila tidak distimulasi.

d. Apoptosis (*programmed cell death*)

Sebagian limfosit yang diaktivasi berproliferasi tetapi tidak berubah menjadi sel efektor atau sel memori. Sebaliknya limfosit ini mengalami kematian terprogram yang dikenal sebagai apoptosis. Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang fisiologik dan teratur dimana nukleus mengalami kondensasi dan fragmentasi, sitoplasma membengkak mengalami vakuolisasi, dan sel itu kemudian difagositosis tanpa melepaskan sisinya (Kresno, 2001).

Limfosit dapat dibagi dalam dua golongan, limfosit T dan limfosit B, yang terdapat dalam peredaran darah dan sistem retikuloendoteial (RES), baik yang normal maupun abnormal, bahkan dalam tumor ganas jaringan limforetikular.

1. Limfosit T

Limfosit T merupakan bagian terbesar (70%) dari seluruh jumlah limfosit yang ada dalam sirkulasi maupun dalam jaringan. Sel-sel ini mempunyai fungsi yang sangat luas baik dalam respon imunologis seluler maupun humoral. Kelenjar timus sangat berpengaruh terhadap proses maturasi limfosit T; pada proses maturasi inilah sifat antigenik yang terdapat pada permukaan sel, timbul atau menghilang (Widmann, 1995).

Delapan puluh persen dari limfosit yang beredar adalah sel T yang memiliki dua fungsi imunologik, yaitu sebagai efektor dan regulator. Fungsi efektor meliputi sitolisis sel yang terinfeksi virus, target tumor dan produksi limfokin. Fungsi pengaturan disempurnakan oleh kemampuan sel T untuk meningkatkan atau menekan limfosit lain serta sel asesoris (Fike, 1997).

2. Limfosit B

Limfosit B yang merupakan 10-20% dari jumlah limfosit yang ada dalam sirkulasi, berperan dalam imunitas humoral. Pembentukan imunoglobulin (antibodi) sebenarnya terjadi di dalam sel plasma, yaitu bentuk perkembangan limfosit B yang paling matang. Limfosit B yang teraktivasi oleh antigen tertentu, mengalami transformasi menjadi sel plasma yang membentuk antibodi, atau sel B yang bentuknya tidak berubah tetapi mempunyai daya ingat terhadap aktivasi antigen tersebut (*memory cells*) (Widmann, 1995).

Antigen yang masuk dalam tubuh, akan merangsang tubuh untuk mengeluarkan antibodi yaitu molekul protein yang diproduksi oleh makhluk hidup sebagai suatu respon terhadap adanya molekul asing (antigen) yang berhasil lolos dari mekanisme pertahanan alami tubuh. Molekul ini mempunyai kemampuan yang unik untuk mengidentifikasi dan bereaksi secara spesifik terhadap antigen (Sardjoko, 1991).

Pada dasarnya antibodi itu merupakan gama globulin yang disebut *immunoglobulin*, yang berat molekulnya kira-kira antara 150.000-900.000. biasanya immunoglobulin merupakan sekitar 20% dari seluruh plasma protein (Guyton, 1996).

Molekul immunoglobulin mempunyai 4 rantai polipeptida dasar yang terdiri atas 2 rantai berat (*heavy chain*) dan 2 rantai ringan (*light chain*) yang identik serta dihubungkan satu sama lain oleh ikatan disulfida (Baratawidjaja, 2000).

Terdapat 5 kelas antibodi, dengan sturuktur dan fungsi yang berbeda,yaitu : IgG, IgM, IgA, IgD, dan IgE.

a. Immunoglobulin G (IgG)

IgG merupakan komponen utama immunoglobuin serum, dengan berat molekul 160.000 dalton. IgG bisa menembus plasenta dan berperan pada imunitas bayi sampai umur 6-9 bulan (Baratawidjaja, 2000). Dalam serum orang dewasa normal, IgG merupakan 75% dari immunoglobulin total, dan dijumpai dalam bentuk monomer. IgG merupakan immunoglobulin utama yang dibentuk atas rangsangan antigen (Kresno, 2001).

Dalam keadaan normal kadarnya berkisar antara 8-15 mg/ml atau 0,8-1,5 g/dl. Dalam menunjukkan respon imunologis terhadap antigen baru, IgG dibentuk agak lambat. IgM dibentuk lebih dulu sebagai respon primer, tetapi setelah IgG spesifik dibentuk, produksinya mungkin tetap berlangsung dan menghasilkan kadar IgG yang tinggi walaupun antigen yang merangsangnya telah hilang. Pemaparan untuk kedua kali atau selanjutnya terhadap antigen yang sama menyebabkan pembentukan IgG lebih cepat, reaksi ini disebut respon sekunder atau reaksi anamnestic, dan hal inilah yang merupakan alasan mengapa kadar IgG tetap tinggi. IgG mempunyai waktu paruh lebih lama dari immunoglobulin yang lain (widmann, 1995).

IgG berperan dalam menangkal penyebaran bakteri dan virus, menetralkan toksin bakteri, mengaktifkan sistem komplemen, dan meningkatkan efektifitas sel fagosit (Case et al, 2001). IgG merupakan Ig utama dalam cairan tubuh internal, terutama ekstrasvaskuler dimana Ig ini memberantas mikroorganisme serta toksinnya (Roitt, 2003).

b. Immunoglobulin M (IgM)

IgM merupakan antibodi pertama yang dibentuk dalam respon imun, dengan berat molekul 900.000 dalton (Baratawidjaja, 2000). IgM mempunyai struktur pentamer yang terdiri atas 5 monomer. Monomer-monomer tersebut disatukan oleh ikatan bisulfida antara domain dari rantai berat yang konstan. IgM umumnya terdapat dalam jaringan darah dan tidak masuk ke jaringan sekitarnya (Case et al, 2001).

Kebanyakan antibodi alamiah seperti *isoagglutinin*, golongan darah AB, antibodi heterofil adalah IgM. IgM sangat penting dalam diagnosis penyakit, karena IgM merupakan antibodi yang pertama kali muncul pada respon imunologik primer (Case et al,2001).

c. Immunoglobulin A (IgA)

IgA secara selektif terdapat dalam sekresi seromukus seperti liur, air mata, cairan rongga hidung, keringat kolostrum, dan cairan sekresi paru-paru, genitourinaria dan saluran cerna (Roitt, 2003). Immunoglobulin ini mempunyai berat molekul 165.000 dalton (Baratawidjaja, 2000).

Fungsi utama dari IgA sekretori adalah melindungi membran mukosa terhadap serangan patogen, khususnya virus dan bakteri tertentu. IgA sangat penting dalam pertahanan terhadap patogen saluran nafas (Case et al, 2001).

d. Immunoglobulin D (IgD)

IgD ditemukan dalam kadar yang rendah, sekitar 0,2% dari total antibodi serum. IgD ditemukan dalam darah, limpa, serta permukaan sel B (Case et al, 2001).

e. Immunoglobulin E (IgE)

Berat molekul IgE adalah 200.000 dalton. IgE juga disebut antibodi reagenik dan merupakan immunoglobulin dalam jumlah paling sedikit pada serum. Meskipun begitu efeknya sangat efisien. IgE mudah diikat oleh sel-sel mastosit, basofil, dan eosinofil yang pada permukaannya memiliki reseptor untuk fraksi fc dari IgE. IgE dibentuk setempat oleh sel plasma dalam selaput lendir saluran nafas dan cerna (Baratawidjaja, 2000).

2.2. Immunologi infeksi

Bila suatu mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur dan parasit seperti protozoa dan cacing menembus kulit atau selaput lendir, maka tubuh akan mengeluarkan empat komponen utama sistem imun yaitu antibodi, sistem komplemen, makrofag dan granulosit untuk menghancurkannya.

Antigen yang masuk kedalam tubuh, akan merangsang tubuh untuk mengeluarkan antibodi yaitu molekul protein yang diproduksi oleh makhluk hidup sebagai suatu respon terhadap adanya molekul asing (antigen) yang berhasil lolos dari mekanisme pertahanan alami tubuh. Molekul ini mempunyai kemampuan yang unik untuk mengidentifikasi dan bereaksi secara spesifik terhadap antigen (Sardjoko, 1991).

2.3. Antigen

Antigen yaitu substansi atau senyawa yang dikenali oleh tubuh sebagai benda asing sehingga memacu terbentuknya antibodi. Jenis antigen dapat berupa protein, polisakarida, lipid, asam nukleat dan lain sebagainya. Ciri-cirinya yaitu ukurannya besar dengan $BM > 5000$. Antigen merupakan molekul yang besar namun tidak semua bagian molekul yang dikenali oleh antibodi, yang dikenali hanya sebagian saja yang disebut epitop.

Macam antigen berdasarkan lokasinya dibagi 2 yaitu :

- a) antigen seluler yaitu tubuh dapat mengenali antigen jika sudah berada dalam sel contohnya yaitu virus.



- b) Antigen ekstraseluler yaitu antigen yang berada diluar sel langsung dapat dikenali oleh tubuh contohnya yaitu bakteri, protein asing dan lain-lain.

Hepatitis A adalah penyakit hati yang disebabkan oleh suatu Hepatovirus spesifik, berukuran 27 nm, berbentuk heksagonal, dengan *single stranded RNA* dan digolongkan virus *Picornaviridae* (Kresno, 1996).

Vaksin hepatitis A merupakan vaksin yang berisi virus hepatitis A yang diinaktivasi dengan formaldehid dan teradsorpsi pada permukaan adjuvan alumunium hidroksida (Anonim, 2003^a).

Vaksin Hepatitis A adalah perlindungan terbaik bagi Hepatitis A. vaksin tersebut tersedia dalam tiga jenis yaitu Vaqta[®], Havrix[®], Twinrix[®] dikombinasikan dengan vaksin Hepatitis B, vaksin Hepatitis A dalam perdagangan berisi organisme yang tidak diaktifkan.

Bukti seseorang terkena infeksi hepatitis A yang baru saja terjadi yaitu ditemukannya antibodi-HAV IgM dalam serum, HAV dalam tinja dan HAV dalam darah. Sedangkan infeksi Hepatitis A yang pernah terjadi pada masa lampau ditandai dengan ditemukannya antibodi anti-HAV IgG dalam serum (Kline, 2003).

2.4. Imunostimulan

Imunomodulasi yaitu cara untuk mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan. Obat-obatan yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun disebut imunomodulator. Obat golongan imunomodulator bekerja menurut 3 cara, yaitu melalui imunorestorasi, imunostimulasi, imunosupresi (Baratawidjaja, 2000).

Imunorestorasi ialah suatu cara untuk mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu dengan memberikan berbagai komponen sistem imun, seperti imunoglobulin.

Imunostimulasi adalah cara untuk memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem imun tersebut. Bahan-bahan yang dapat meningkatkan respon imun disebut *immunostimulator*, misalnya levamisol hidroklorida yang merupakan obat cacing yang dapat meningkatkan respon imun tubuh (*immunostimulator*). Dimana mekanismenya yaitu dapat meningkatkan proliferasi (perkembangan sel T) dan sitotoksisitas sel T (kemampuan menghancurkan mikroorganisme atau antigen). Levamisol dapat meningkatkan efek berbagai bahan seperti antigen untuk merangsang limfosit, granulosit, makrofag (Baratawidjaja, 2000).

Imunosupresi merupakan suatu tindakan untuk menekan respon imun. Kegunannya di klinik terutama pada transplantasi alat tubuh dalam usaha mencegah reaksi penolakan dan pada penyakit autoimun untuk menghambat pembentukan antibodi (Baratawidjaja, 2000).

Fungsi limpa adalah merupakan tempat terjadinya respon imun terhadap antigen yang masuk melalui sirkulasi darah, limpa juga menghasilkan limfosit, limpa juga terlibat dalam perlindungan terhadap penyakit dan menghasilkan zat-zat antibodi (Evelyn, 1999).

4. Kultur sel

Kultur sel dilakukan dengan cara mendispersikan jaringan dari eksplan, menjadi suspensi sel yang bisa dikultur menjadi 1 lapis atau sebagai kultur suspensi. Kultur sel memiliki keuntungan yaitu pengontrolan lingkungan fisik lebih bisa diatur, sampel homogen, serta bahan yang diperlukan relatif lebih sedikit daripada bila menggunakan model binatang percobaan. Namun sel hasil kultur kestabilannya rendah dan sulit untuk dipelihara. Selain itu, pertumbuhan yang diperoleh sedikit meskipun biayanya tinggi. Kerapatan dan viabilitas sel dipengaruhi oleh konsentrasi faktor pembatas, faktor penumbuh, metabolit toksis serta kontak dengan inhibitor. Media untuk kultur sel dipengaruhi oleh pH, kandungan O₂, temperatur, osmolalitas (Freshney, 1999).

5. *Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)*

ELISA merupakan imunoassay heterogen dengan label enzim dan menggunakan fase padat dalam teknik pemisahannya (Sheehan, 1997).

Antigen atau antibodi dari spesimen yang ditangkap oleh antibodi spesifik atau antigen yang melapisi penyangga fase padat pada ELISA, bergabung dengan antibodi spesifik yang dilabel dengan enzim yang ditambahkan secara

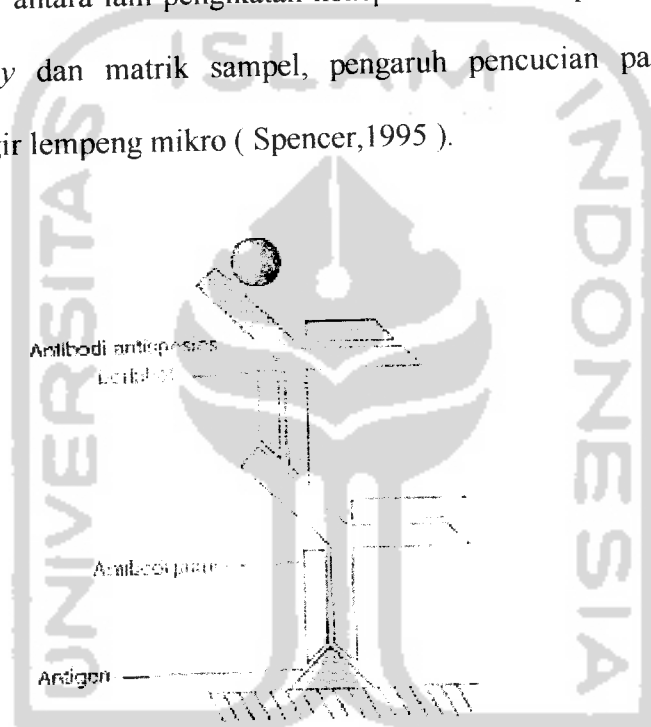
proporsional terhadap jumlah antigen atau antibodi yang terikat. Perubahan warna yang terjadi pada penambahan substrat enzim proporsional dengan jumlah antibodi atau antigen dalam spesimen (Lechtmann dan Wistreich,1988).

Ada dua metode dalam ELISA yaitu :

(a) ELISA langsung, langkah pertama yaitu antibodi spesifik untuk antigen yang dideteksi dilekatkan pada permukaan sumuran lempeng mikrotiter. Sampel yang mengandung antigen yang akan dideteksi ditambahkan ke tiap sumuran. Jika antigen bereaksi spesifik dengan antibodi yang melekat pada sumuran, antigen akan tertahan ketika sumuran dicuci. Langkah selanjutnya ialah penambahan antibodi spesifik. Bila antibodi tersebut bereaksi dengan antigen, akan terbentuk *sanwich* dengan antigen terletak diantara kedua molekul antibodi. Reaksi ini bisa terlihat karena antibodi kedua yang ditambahkan telah dilabel dengan enzim. Antibodi terlabel yang bebas dicuci dari sumuran, lalu substrat enzim ditambahkan. Aktivitas enzim ditunjukkan oeh perubahan warna yang bisa dideteksi secara visual. Tes disebut positif bila antigen bereaksi dengan antibodi yang dilekatkan pertama kali. Jika antigen tidak spesifik untuk antibodi tersebut, tes akan negatif sebab antigen yang bebas akan tercuci (Case et al, 2001).

(b) ELISA tak langsung, antigen yang telah diidentifikasi dilekatkan pada sumuran. Antibodi serum ditambahkan. Bila serum mengandung antibodi spesifik untuk antigen, maka antibodi akan mengikat antigen tersebut. Antiserum yang tidak bereaksi akan tercuci dalam sumuran. Antibodi spesifik yang telah dilabel enzim, bereaksi dengan antibodi yang terikat pada antigen. Antibodi spesifik yang bebas dicuci, lalu substrat yang sesuai untuk enzim ditambahkan. Reaksi

enzimatik yang menimbulkan warna terjadi bila antigen telah bergabung dengan antibodi dalam sampel (Case et al, 2001). Kerapatan optik berbanding secara proporsional dengan konsentrasi antibodi dalam serum(Burgess, 1995). Semua sistem ELISA cenderung mempunyai masalah berkaitan dengan reaksi ELISA yang menyimpang. Reaksi-reaksi yang menyimpang tersebut disebabkan oleh beberapa faktor antara lain pengikatan nonspesifik ke fase padat, interaksi antara komponen *asay* dan matrik sampel, pengaruh pencucian pada ELISA,serta pengaruh pinggir lempeng mikro (Spencer,1995).



Gambar 3. Konfigurasi ELISA tidak langsung

(Burgess, 1995).

6. MTT-Reduction

Tahun 1983 pengukuran kuantitatif kolorimetri untuk kehidupan sel mamalia dan sel perkebangbiakan telah diusulkan oleh mosmann, pengukuran tergantung dari reduksi garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) dari dehidrogenasi mitokondria sel yang sehat untuk membentuk suatu produk formazan biru.

Pengukuran dengan MTT telah banyak digunakan bersamaan dengan pertumbuhan jumlah tipe sel, termasuk kultur sel seperti halnya saat sel dibentuk. Pengukuran dengan kolorimetri mikroplate lebih efektif karena banyaknya tes dapat dilakukan sewaktu-waktu tanpa permasalahan dengan radioisotop dan bahan kontaminan.

Apikasi dari pengukuran MTT yaitu pengamatan dari pengukuran kolorimetri untuk pertumbuhan sel dan kehidupan lebih menawarkan keuntungan dalam kecepatan, lebih sederhana, biaya dan keselamatan di atas perhitungan secara konvensional. MTT assay mempunyai sedikit langkah, menggunakan sedikit materi dan tidak membawa limbah buangan radioaktif (Anonim, 2003^b).

B. Keterangan Empiris

Keterangan empiris yang ingin diperoleh adalah bahwa jus kacang hijau mempunyai aktivitas sebagai imunostimulan.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Bahan

a. Bahan utama

Kacang hijau, *levamisol* (Konimex), RPMI, aquades, Vaksin Hepatitis A yang mengandung protein virus Hepatitis A strain HM 175 (*Smith Kline Beecham*).

b. Bahan untuk kultur limfosit

RPMI 1640 (Sigma), Natrium bikarbonat (Sigma), Hepes (Sigma), *fetal bovine serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco), fungision 0,5% (v/v) (Gibco), basa tris, ammonium klorida, etanol 70%, pereaksi Turk, akuabides.

c. Bahan untuk ELISA

Natrium Klorida, Kalium Klorida, Kalium dihidrogen fosfat, natrium fosfat, tween 20, asam sitrat, hidrogen peroksida 30%, *ortho-phenylendiamine* (OPD) (Sigma), asam sulfat, *goat anti mouse IgM (μ -chain spesifik)* (Sigma), *peroxidase conjugate rabbit anti goat IgG (whole moecule)* (Sigma), *bovine serum albumin* (Gibco).

2. Alat-alat

Merupakan alat yang sudah lazim digunakan di laboratorium, meliputi : inkubator CO₂ 37°C (Heraeus), ELISA reader (Bio Rad), timbangan (Sarforius), Laminar (Labquib), autoklaf, blender, sentrifuge, *Inverted*

mikroskop (Olympus), pendingin, spuit injeksi (Terumo), pinset steril, gunting steril alat bedah, cawan petri diameter 50mm, tabung sentrifus (Falcon), pipet, hemositometer (Neubauer), filter (Pall acrodish), stop watch, mortir, stamper steril, 96- well plate (Nunc), tip kuning, tip biru.

B. Cara Penelitian

1. Pengumpulan bahan

Kacang hijau yang siap panen (masih segar) diambil dari daerah Demak.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas UGM untuk memastikan kebenaran tanaman yang akan diteliti.

3. Sterilisasi alat

Alat-alat gelas, tip kuning, tip biru yang akan digunakan dicuci terlebih dulu dan kemudian dikeringkan. Alat-alat yang sudah kering kemudian dibungkus dengan kertas atau plastik kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C dan dikeringkan kembali dalam oven.

4. Pembuatan larutan stok jus kacang hijau

8 gram kacang hijau ditambahkan larutan RPMI dengan volume 12 ml (40 %).

5. Isolasi limfosit

Mencit dikorbankan dengan menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang lalu disemprot dengan alkohol 70 %. Kulit bagian perut dan selubung peritonium dibuka, limpa diangkat dan diletakkan dalam cawan

petri diameter 50mm yang berisi 5 ml medium RPMI. Limpa disuntikkan dengan medium RPMI 2-3 kali sehingga sel keluar atau terdistribusi dalam medium lalu diamkan selama 0,5 jam - 1 jam untuk mengendapkan vertikel-vertikel limfosit. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifus 10 ml. Sel disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 10 menit. Pellet yang didapat, disuspensikan dalam 2 ml *Tris Buffered Ammonium Chlorid*. Sel dicampur dengan menggunakan pipet dan didiamkan pada suhu ruangan selama 2 menit. FBS sebanyak 1 ml ditambahkan pada dasar tabung dengan menggunakan pipet. Suspensi tersebut kemudian disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit dan supernatannya dibuang. Pellet dicuci dengan RPMI 2 kali dengan cepat dipipet berulang-ulang dan disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan sel limfosit disuspensikan dengan 1 ml medium komplit. Sel dihitung dengan hemositometer. Selanjutnya sel limfosit siap untuk diuji aktivitasnya dan dikultur dalam inkubator CO₂, 37°C. Propagasi dilakukan pada jam ke-24 dan 48 kemudian suspensi sel tersebut disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, supernatan diambil dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

6. Uji immunostimulan menggunakan metode MTT *reduction*

100 µl sel limfosit didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada 96-*well plate* dan diinkubasi dengan seri kadar jus kacang hijau untuk kelompok I jus kacang hijau kadar 5 %, kelompok II: jus kacang hijau 2,5 %, kelompok III : jus kacang hijau 1,25 %, kelompok IV: kadar 0,625% dan kelompok V: kadar 0,3125%. Kelompok VI menggunakan larutan levamisol 100 µl sebagai kontrol positif, kelompok VII menggunakan larutan RPMI 100 µl sebagai kontrol negatif



dan kelompok VIII tanpa penambahan sel. Delapan kelompok tersebut ditambahkan vaksin hepatitis A, masing-masing kelompok dilakukan 3 replikasi. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C.

Setelah diinkubasi selama 24 jam, masing-masing sumuran ditambahkan larutan 20 µl MTT 2,5 µl/ml. Kemudian diinkubasi lagi lebih dari 4 jam pada suhu 37°C. sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu.

Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah *reagen stopper*, yaitu larutan SDS 10 % dalam asam klorida 0,01N sebanyak 100 µl pada tiap sumuran, selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm. Dari hasil serapan tersebut ditentukan presentase proliferasi sel.

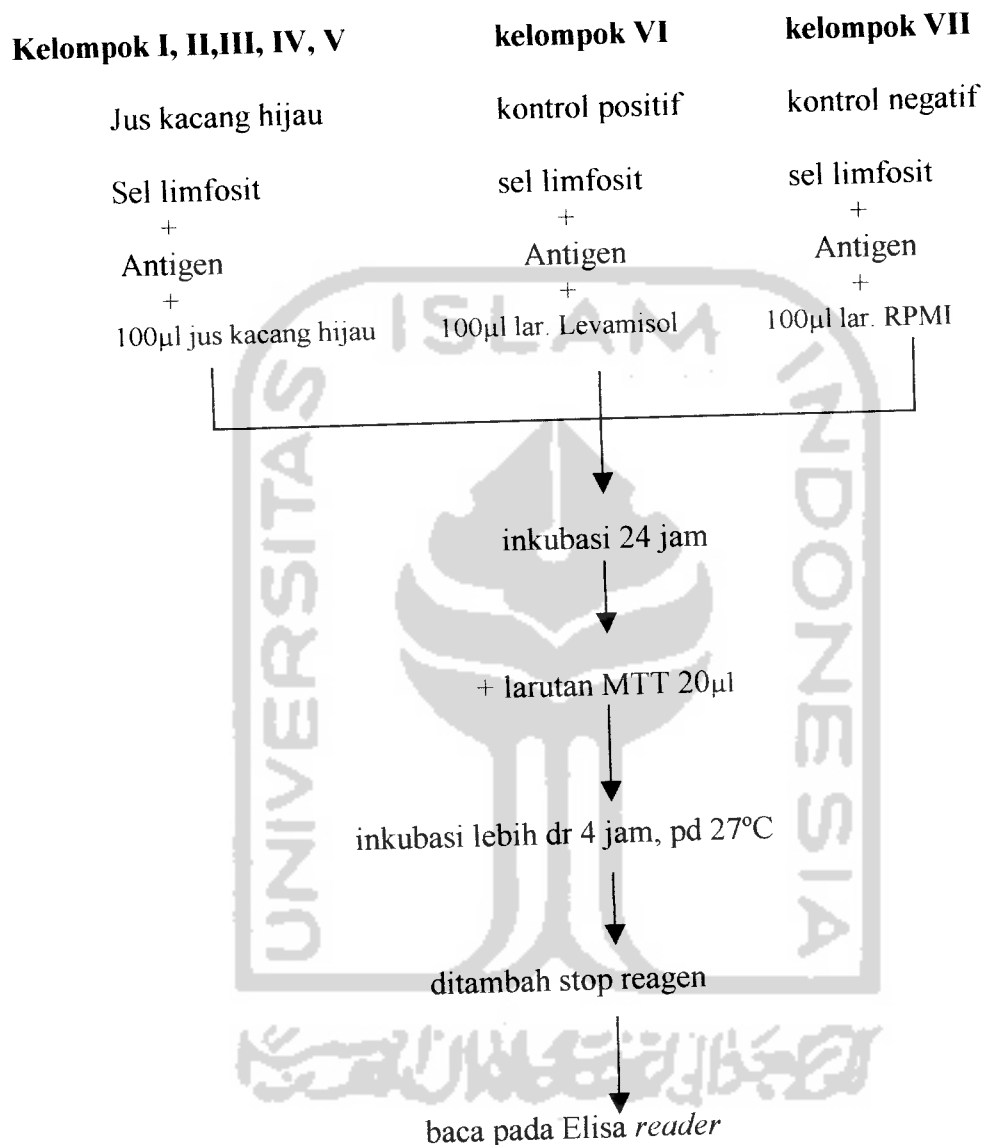
7. Uji produksi antibodi dengan ELISA tidak langsung

Plate dilapisi dengan 100µl antigen, ditutup plastik ditaruh kulkas. Setelah semalam diambil, cuci dengan PBST 3x. Selanjutnya diberi larutan 1% BSA 150µl per well, tutup plastik lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah itu cuci lagi dengan PBST 3x lalu ditambah dengan antibodi primer 100 µl, inkubasi lagi maksimal 2 jam. Setelah 2 jam plate diambil lalu dicuci dengan PBST 3x. Ditambahkan larutan konjugat sebagai antibodi primer sebanyak 100µl lalu inkubasi maksimal 2 jam setelah itu dicuci dengan PBST. Untuk memberikan warna yaitu dengan menambahkan substrat OPD 150µl, lalu disimpan pada tempat yang gelap (suhu kamar) selama 30 menit atau jika sudah memberikan

C. Analisis

proliferasi d
ianalisa meng
a perbedaan y

warna kuning sampai oranye, kemudian ditambah stop reagen yaitu H_2SO_4 , selanjutnya dibaca absorban pada elisa reader dengan panjang gelombang 490 nm.



(Anonim, 2003).

Catatan :

- ✓ Kadar jus kacang hijau kelompok I: 5%, kelompok II: 2,5%, kelompok III: 1,25%, IV: 0,625% dan V:0,3125%. Masing-masing kelompok dilakukan 3 replikasi.
- ✓ Antigen yang digunakan Vaksin Hepatitis A.

Gambar 4. Skema cara penelitian uji imunostimulan dengan MTT

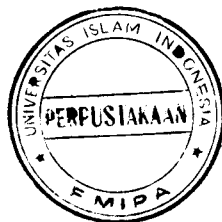
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Beberapa jenis bahan pangan tak sekedar mengandung zat-zat gizi yang menyehatkan. Namun juga berkhasiat menguatkan sistem kekebalan tubuh dan menangkal penyakit (Krisnawati, 2003), salah satunya adalah kacang hijau. Kacang hijau banyak mengandung protein yang diduga dapat meningkatkan sistem imun, untuk itu dilakukan penelitian ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunostimulan dari jus kacang hijau, yang diujikan secara *invitro* terhadap limfosit yang diisolasi dari limpa mencit dengan menggunakan metode *MTT-Reduction*. Mencit yang digunakan adalah mencit jantan galur BALB/C. Aktivasnya dilihat melalui pengaruhnya terhadap proliferasi limfosit dan mengamati pengaruhnya terhadap produksi antibodi.

Antibodi akan terbentuk jika ada antigen yang masuk dalam tubuh. Antigen yang digunakan adalah vaksin Hepatitis A (Havrix®). Penggunaan Havrix® didasarkan atas pertimbangan biaya dan mudah untuk diperoleh. Sebagai pembandingnya (kontrol positif) digunakan Levamisol. Levamisol dapat meningkatkan efek berbagai bahan seperti antigen, limfokin dan faktor kemotaktik untuk merangsang limfosit, granulosit dan makrofag (Baratawidjaja, 2002). Kadar levamisol yang digunakan adalah 331,5µg.



A. Pembuatan jus kacang hijau

Kacang hijau yang sebelumnya telah direndam ditambahkan medium RPMI sebagai pelarut lalu diblender hingga konsistennya homogen. Selanjutnya dilakukan sentrifuse yaitu untuk memisahkan cairan dari ampasnya agar mudah dalam proses filtrasi. Karena jus yang diperoleh masih sangat kental maka dilakukan sentrifuse berulang-ulang dan dibuat pengecilan seri kadar dengan pengenceran menjadi 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625% dan 0,3125%.

B. Isolasi dan kultur sel limfosit dari limpa mencit

Hewan uji yang digunakan adalah mencit karena mencit mempunyai susunan makanan mirip manusia (Purwanti, 2002) dan juga mempunyai respon imun yang bagus.

Limpa merupakan organ limfoid sekunder utama yang berfungsi sebagai tempat utama produksi antibodi dan sensitisasi sel T yang antigennya spesifik. Selain itu di dalam sirkulasi arus limfosit, limpa merupakan tempat yang dilewati arus limfosit dalam darah menuju *marginal zone* dan kembali masuk ke dalam darah (Baratawidjaja, 2000). Pulpa putih dari limpa duapertiganya merupakan CD₄⁺ yang merupakan ko-reseptor yang menentukan sel T helper sebagai penolong dalam proliferasi sel B.

Limpa terletak di sebelah kiri abdomen, terletak pada rongga perut bagian kiri atas dekat diafragma. Limpa yang sudah diambil dari mencit diletakkan dalam petridish yang di dalamnya terdapat medium RPMI lalu dicuci dan dipindah dari satu petri ke petri lain dan diulangi sampai 3 kali.

Untuk mendapatkan suspensi sel dari limpa dengan pemompaan medium RPMI ke dalam salah satu ujung limpa dengan jarum suntik sehingga dapat merusak susunan limfosit dan mendorongnya keluar beserta sel darah merah dan jaringan lainnya. Cara ini dianggap cara paling minim untuk merusak sel atau disebut dengan metode ekstruksi. Limpa terdiri atas pulpa merah yang terutama merupakan tempat penghancuran eritrosit (sel darah merah) dan pulpa putih yang terdiri atas jaringan limfoid. Untuk merusak sel darah merah dilakukan dengan penambahan *buffer ammonium klorida* yang merupakan larutan hipotonik. Sedangkan untuk membantu perkembangbiakan limfosit dipacu dengan penambahan FBS (*Fetal Bovine Serum*).

Jumlah sel dihitung dengan hemositometer. Jumlah sel dalam suspensi tidak dapat digunakan sebagai ukuran terhadap tingkat respon imun karena jumlah sel sangat tergantung pada proses isolasi limpa dan pengeluaran sel dari limpa. Penghitungan sel hanya untuk mengetahui volume suspensi sel yang harus diambil untuk memperoleh $1,5 \times 10^6$ sel / 1 ml medium yang dibutuhkan untuk propagasi.

C. Pengukuran proliferasi limfosit dengan metode *MTT-reduction*

Jus kacang hijau dan kultur sel limfosit yang telah dibuat kemudian didistribusikan ke dalam sumuran plate dengan menambahkan vaksin Hepatitis A sebagai antigen, untuk merangsang timbulnya respon imun yang berupa proliferasi sel dan produksi antibodi. Jus kacang hijau dengan perlakuan seri kadar 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125% diharapkan dapat juga meningkatkan respon

imun tersebut. Perlakuan tersebut kemudian dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif menggunakan metode MTT *reduction* untuk melihat tingkat respon imun yang ditimbulkan akibat perlakuan seri kadar jus kacang hijau . Levamisol digunakan sebagai kontrol positif karena memang sudah terbukti dapat mempengaruhi sistem imun humoral dan sistem imun seluler dan mempengaruhi sel T pada tingkat yang lebih besar daripada sel B (Anonim, 2003c). Untuk mengoptimalkan interaksinya dilakukan inkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

Setelah diinkubasi perlakuan selanjutnya adalah mengambil sebanyak 180µl dari tiap sumuran pada setiap seri kadar begitu juga dengan kontrol negatif dan positif yang dipindahkan ke plate khusus antibodi untuk melihat produksi antibodinya. Sisa yang masih ada pada plate pertama ditambah dengan medium komplet 10% lalu ditambah larutan MTT yang kemudian diinkubasi selama lebih dari 4 jam. Setelah 4 jam lalu ditambah stop reagen (SDS 10%) yang bertujuan untuk menyetop reaksi MTT selanjutnya dibaca absorbansinya pada ELISA reader.

Mekanisme reaksi MTT tergantung dari reduksi garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yang berasal dari dehidrogenase mitokondria sel yang sehat untuk membentuk suatu produk formazon biru. Semakin banyak sel hidup yang bereaksi dengan MTT, maka senyawa formazon yang dihasilkan akan semakin banyak dan warna yang dihasilkan akan semakin tua.

Uji imunologi dengan MTT bertujuan untuk mengetahui apakah terjadi proliferasi sel dengan melihat data absorbansi tanpa menghitung sel dengan mikroskop. Apabila dari metode ini sudah dapat mengetahui ada tidaknya proliferasi sel maka tidak perlu menghitung kenaikan sel dengan menghitung memakai mikroskop.

Data absorbansi proliferasi limfosit dengan metode MTT *reduction* dapat dilihat pada tabel I :

Tabel I. Hasil pengukuran proliferasi limfosit menggunakan MTT *reduction*

Kelompok	Inkubasi 24 jam	Inkubasi 48 jam
Kadar 5%	0,395	0,560
	0,378	0,532
	0,507	0,528
Rata-rata	0,427 ± 0,070	0,540 ± 0,017
Kadar 2,5 %	0,433	0,525
	0,464	0,532
	0,507	0,541
Rata-rata	0,468 ± 0,037	0,533 ± 0,008
Kadar 1,25%	0,457	0,532
	0,410	0,483
	0,553	0,663
Rata-rata	0,473 ± 0,073	0,559 ± 0,093
Kadar 0,625%	0,638	0,735
	0,791	0,702
	0,758	0,658
Rata-rata	0,729 ± 0,081	0,698 ± 0,039
Kadar 0,3125%	0,451	0,508
	0,555	0,492
	0,443	0,633
Rata-rata	0,483 ± 0,062	0,544 ± 0,077
Kontrol negatif	0,379	0,436
	0,369	0,432
	0,379	0,495
Rata-rata	0,376 ± 0,006	0,454 ± 0,035
Kontrol positif	0,414	1,448
	0,419	1,618
	0,410	1,583
Rata-rata	0,414 ± 0,005	1,549 ± 0,089
Tanpa sel	0,058	0,031
	0,037	0,089
	0,065	0,057
Rata-rata	0,053 ± 0,015	0,059 ± 0,029

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa data absorbansi mengalami kenaikan dari inkubasi 24 jam ke 48 jam. Pada kontrol positif, waktu inkubasi 48 jam memperlihatkan kenaikan absorbansi, begitu juga pada perlakuan seri kadar jus kacang hijau dan kontrol negatif juga meningkat absorbansinya. Dari pernyataan ini mungkin dapat diduga bahwa protein dalam kacang hijau mampu beraktivitas sebagai imunostimulan dan stabil pada waktu inkubasi yang lama, begitu juga pada levamisol sudah terbukti mampu meningkatkan proliferasi limfosit (khususnya sel T) (Baratawidjaja, 2000).

Dari data absorbansi tersebut, kemudian dianalisis dengan statistika menggunakan anava satu jalan yang bertujuan untuk lebih meyakinkan apakah antara seri kadar tersebut berbeda signifikan atau tidak. Analisa dilakukan dengan membandingkan tiap kadar dengan tiap waktu inkubasi, dilihat pada masing-masing kadar terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak. Berbeda signifikan atau tidaknya dapat dilihat dari nilai probabilitasnya. Bila nilai probabilitas $< 0,05$ itu berarti berbeda signifikan begitu juga sebaliknya bila nilai probabilitas $> 0,05$ maka artinya tidak ada perbedaan yang signifikan.

Tabel II. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan, proliferasi limfosit dengan waktu inkubasi 24 jam

KELOMPOK	KELOMPOK	SIG.	KETERANGAN
Kadar 5%	Kadar 2,5%	0.974	Tidak signifikan
	Kadar 1,25%	0.951	Tidak signifikan
	Kadar 0,625%	0.000	Signifikan
	Kadar 0,3125%	0.883	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0.926	Tidak signifikan
	Kontrol positif	1.000	Tidak signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kadar 2,5%	Kadar 1,25%	1.000	Tidak signifikan
	Kadar 0,625%	0.000	Signifikan
	Kadar 0,3125%	1.000	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0.430	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0.906	Tidak signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kadar 1,25%	Kadar 0,625%	0.000	Signifikan
	Kadar 0,3125%	1.000	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0.366	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0.858	Tidak signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kadar 0,625%	Kadar 0,3125%	0.001	Signifikan
	Kontrol negatif	0.000	Signifikan
	Kontrol positif	0.000	Signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kadar 0,3125%	Kontrol negatif	0.265	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0.747	Tidak signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kontrol negatif	Kontrol positif	0.982	Tidak signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kontrol positif	Tanpa sel	0.000	Signifikan

Uji Tukey di atas merupakan hasil absorbansi pada waktu inkubasi 24 jam, tampak bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara levamisol dengan perlakuan seri kadar jus kacang hijau kecuali pada kadar 0,6125%. Begitu juga dengan kontrol negatif, kesemuanya (perlakuan jus dan kontrol positif) tidak ada perbedaan yang nyata. Hal ini mungkin disebabkan karena memang pada kadar-kadar tersebut mampu menimbulkan respon imun seperti halnya levamisol atau

kesalahan prosedur pelaksanaannya dimana kontrol negatif seharusnya menunjukkan perbedaan yang nyata dengan perlakuan jus dan kontrol positif.

Dari uji Tukey juga tampak bahwa ada perbedaan yang nyata antara kelompok tanpa sel dengan semua kelompok perlakuan, ini membuktikan bahwa imunitas spesifik dihasilkan oleh sistem imun yang membentuk antibodi dan mengaktifkan limfosit yang mampu menyerang dan menghancurkan organisme spesifik (Guyton, 1997).

Hal ini diperkuat oleh hasil *Homogeneous Subset*, dimana antara subset yang berbeda secara nyata akan berada pada kolom yang berbeda, sedangkan yang tidak berbeda akan terdapat dalam satu kolom. Pada subset jus kacang hijau kadar 0,625% dan kelompok tanpa sel yang terpisah dari kelompok yang lain. Untuk itu dapat disimpulkan bahwa jus kacang hijau dengan kadar 0,6125% mempunyai aktivitas imunostimulan dengan adanya peningkatan proliferasi sel. Sedangkan pada seri kadar yang lain tidak memberikan perbedaan yang signifikan ketika dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

Tabel III. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan, proliferasi limfosit dengan waktu inkubasi 48 jam

KELOMPOK	KELOMPOK	SIG.	KETERANGAN
Kadar 5%	Kadar 2,5%	1.000	Tidak signifikan
	Kadar 1,25%	1.000	Tidak signifikan
	Kadar 0,625%	0.060	Tidak signifikan
	Kadar 0,3125%	1.000	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0.618	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0.000	Signifikan
Kadar 2,5%	Tanpa sel	0.000	Signifikan
	Kadar 1,25%	0.999	Tidak signifikan
	Kadar 0,625%	0.045	Signifikan
	Kadar 0,3125%	1.000	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0.709	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0.000	Signifikan
Kadar 1,25%	Tanpa sel	0.000	Signifikan
	Kadar 0,625%	0.126	Tidak signifikan
	Kadar 0,3125%	1.000	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0.385	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0.000	Signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kadar 0,625%	Kadar 0,3125%	0.071	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0.002	Signifikan
	Kontrol positif	0.000	Signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kadar 0,3125%	Kontrol negatif	0.563	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0.000	Signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kontrol negatif	Kontrol positif	0.000	Signifikan
	Tanpa sel	0.000	Signifikan
Kontrol positif	Tanpa sel	0.000	Signifikan

Tabel Tukey di atas merupakan hasil absorbansi pada waktu inkubasi 48 jam, tampak bahwa ada perbedaan yang signifikan antara levamisol dengan semua perlakuan seri kadar jus kacang hijau, begitu juga dengan kelompok tanpa sel. Sedangkan kontrol negatifnya hanya berbeda signifikan pada kadar 0,625%. Hal ini dapat dilihat pada tabel *Homogeneous Subset*.

Dari dua tabel Tukey di atas antara waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam dapat disimpulkan bahwa kontrol positif yaitu levamisol hanya berbeda signifikan dengan kadar 0,625% pada waktu inkubasi 48 jam, sedangkan pada inkubasi 24 jam tidak ada perbedaan yang signifikan. Ini berarti semakin lama waktu inkubasi maka semakin besar data absorbansi (peningkatan proliferasi).

D. Pengukuran produksi antibodi dengan metode ELISA tidak langsung

Limfosit T yang bertanggung jawab untuk respons seluler dirangsang untuk memproduksi sejumlah zat yang diperlukan untuk memacu berbagai reaksi, sedangkan aktivasi sel B mengakibatkan sel B berproliferasi dan berdiferensiasi kemudian memproduksi antibodi dengan kata lain antibodi diproduksi oleh sel B. Sel B berperan pada sistem imun humoral.

Urutan kerjanya adalah plate antibodi yang berisi kultur sel (serum) pada perlakuan setelah inkubasi sebelum diberi MTT yang merupakan antibodi primer dimasukkan dalam kulkas. Untuk prosedur coating antigen, yaitu plate tampungan diisi havrix (sebagai antigen yang akan merangsang terjadinya respon imun) lalu ditutup dengan plastik dimasukkan dalam kulkas selama semalam. Setelah semalam lalu dibuka plastiknya dibuang isinya dengan keras, setelah itu disemprot dengan PBST (Phosphate Buffered Saline dengan Tween20) sampai penuh didiamkan 1 menit lalu dibalik dengan keras di wastafel terus diketok-ketok di atas tisu dan diulangi 3 kali. Pencucian PBST bertujuan untuk menghilangkan bahan dari luar dan antigen yang tidak terikat pada matriks padat. Selanjutnya diberi larutan blocking 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) ditutup

dengan plastik lalu dimasukkan inkubator 37°C selama 1 jam. Penambahan larutan blocking yaitu untuk menghindari binding (pengikatan) nonspesifik. Larutan BSA merupakan reagen sekunder yang berfungsi untuk mengisi tempat-tempat yang tertinggal pada matriks padat sehingga menghambat pengikatan nonspesifik reagen berikutnya.

Baru kemudian ditambahkan antibodi primer (tidak berlabel) lalu diinkubasi untuk mengoptimalkan reaksi antara antigen antibodi. Proses ini diakhiri dengan pencucian dengan PBST. Setelah itu ditambah konjugat peroksidase (antibodi sekunder) yaitu isotope *anti-mouse polyvalent peroksidase konjugat* diinkubasi lagi selama 1 jam lalu dicuci dengan PBST. Selanjutnya ditambah OPD substrat buffer disimpan pada tempat gelap selama 30 menit atau sampai sudah terbentuk warna kuning atau oranye. Bila antibodi yang dideteksi tidak sesuai dengan isotope yang ditambahkan maka tidak akan mengikat antibodi sehingga konjugat peroksidase tidak akan menempel dan tidak terjadi degradasi warna karena penambahan substrat tersebut. Enzim yang terlabel pada antibodi sekunder bersama peroksidase menghasilkan oksigen. Oksigen mengoksidasi substrat OPD yang merupakan kromogen tereduksi menghasilkan senyawa berwarna oranye atau kuning (OPD tereduksi), lalu diukur dengan ELISA reader.

ELISA merupakan cara untuk menunjukkan adanya reaksi imunologis dengan menggunakan aktivasi enzim sebagai indikator. Biasanya enzim dilekatkan pada antibodi; bila antibodi ini bereaksi dengan antigen, antibodi mengadakan perubahan yang mengaktifasi enzim. Metode yang digunakan adalah

ELISA tidak langsung yang merupakan konfigurasi paling sederhana untuk pengukuran antibodi.

Pada penelitian ini menggunakan titer antibodi secara umum yaitu titer (anti-mouse polyvalent) sehingga data produksi antibodi yang dihasilkan hanya menunjukkan bahwa terjadi pembentukan antibodi secara umum, tidak spesifik untuk imunoglobulin tertentu.

Data absorbansi produksi antibodi dapat dilihat pada tabel IV:

Tabel IV . Hasil pengukuran antibodi dengan metode ELISA tidak langsung

KELOMPOK	INKUBASI 24 JAM	INKUBASI 48 JAM
Kadar 5%	0,147	0,137
	0,185	0,127
	0,179	0,152
Rata-rata	0,170 ± 0,020	0,139 ± 0,013
Kadar 2,5%	0,154	0,102
	0,131	0,145
	0,143	0,173
Rata-rata	0,143 ± 0,011	0,140 ± 0,036
Kadar 1,25%	0,153	0,154
	0,137	0,178
	0,133	0,205
Rata-rata	0,141 ± 0,011	0,179 ± 0,026
Kadar 0,625%	0,172	0,253
	0,235	0,305
	0,186	0,265
Rata-rata	0,198 ± 0,033	0,274 ± 0,027
Kadar 0,3125%	0,163	0,164
	0,156	0,175
	0,146	0,204
Rata-rata	0,155 ± 0,008	0,181 ± 0,021
Kontrol negatif	0,164	0,189
	0,189	0,191
	0,207	0,204
Rata-rata	0,187 ± 0,022	0,195 ± 0,008
Kontrol positif	0,390	0,275
	0,317	0,274
	0,350	0,260
Rata-rata	0,352 ± 0,036	0,271 ± 0,006
Tanpa sel	0,020	0,052
	0,024	0,046
	0,029	0,061
Rata-rata	0,024 ± 0,004	0,053 ± 0,008

Dari data absorbansi produksi antibodi, dapat dilihat bahwa pada kontrol positif mengalami penurunan pada waktu inkubasi 48 jam. Pada perlakuan seri kadar jus kacang hijau untuk kadar 5%, 2,5% sama seperti kontrol positif yaitu terjadi penurunan absorbansi untuk waktu inkubasi 48 jam. Sedangkan untuk kadar 1,25%, 0,6125%, 0,3125%, kontrol negatif dan tanpa sel pada waktu inkubasi 48 jam mengalami kenaikan absorbansi. Akan tetapi yang menunjukkan perbedaan yang nyata adalah kadar 0,625%.

Dari data absorbansi tersebut, kemudian dianalisis dengan statistika menggunakan anava satu jalan yang bertujuan untuk lebih meyakinkan apakah antara seri kadar tersebut berbeda signifikan atau tidak. Analisa dilakukan dengan membandingkan tiap kadar dengan tiap waktu inkubasi, dilihat pada masing-masing kadar terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak. Berbeda signifikan atau tidaknya dapat dilihat dari nilai probabilitasnya. Bila nilai probabilitas $< 0,05$ itu berarti berbeda signifikan begitu juga sebaliknya bila nilai probabilitas $> 0,05$ maka artinya tidak ada perbedaan yang signifikan.

Data uji Tukey waktu inkubasi 24 jam :

Tabel V. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan, produksi antibodi dengan waktu inkubasi 24 jam

KELOMPOK	KELOMPOK	SIG.	KETERANGAN
Kadar 5%	Kadar 2,5%	0,752	Tidak signifikan
	Kadar 1,25%	0,698	Tidak signifikan
	Kadar 0,625%	0,762	Tidak signifikan
	Kadar 0,3125%	0,984	Tidak signifikan
Kadar 2,5%	Kontrol negatif	0,977	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0,000	Signifikan
	Tanpa sel	0,000	Signifikan
	Kadar 1,25%	1,000	Tidak signifikan
Kadar 1,25%	Kadar 0,625%	0,088	Tidak signifikan
	Kadar 0,3125%	0,996	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0,254	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0,000	Signifikan
Kadar 0,625%	Tanpa sel	0,000	Signifikan
	Kadar 0,625%	0,074	Tidak signifikan
	Kadar 0,3125%	0,990	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0,219	Tidak signifikan
Kadar 0,3125%	Kontrol positif	0,000	Signifikan
	Tanpa sel	0,000	Signifikan
	Kadar 0,3125%	0,284	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0,998	Tidak signifikan
Kontrol negatif	Kontrol positif	0,000	Signifikan
	Tanpa sel	0,000	Signifikan
	Tanpa sel	0,000	Signifikan
Kontrol positif	Tanpa sel	0,000	Signifikan

Dari tabel uji Tukey dengan inkubasi 24 jam tampak bahwa pada kadar 5%, 2,5%, 1,25%, dan 0,3125% tidak berbeda signifikan satu sama lain, yang berbeda signifikan hanya pada kadar 0,6125% dengan kontrol positif dan tanpa sel. Sedangkan kontrol negatif hanya berbeda signifikan dengan kontrol positif dan tanpa sel.

Tabel VI. Hasil uji Tukey antar kelompok perlakuan, produksi antibodi dengan waktu inkubasi 48 jam

KELOMPOK	KELOMPOK	SIG.	KETERANGAN
Kadar 5%	Kadar 2,5%	1,000	Tidak signifikan
	Kadar 1,25%	0,308	Tidak signifikan
	Kadar 0,625%	0,000	Signifikan
	Kadar 0,3125%	0,259	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0,065	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0,000	Signifikan
	Tanpa sel	0,002	Signifikan
Kadar 2,5%	Kadar 1,25%	0,345	Tidak signifikan
	Kadar 0,625%	0,000	Signifikan
	Kadar 0,3125%	0,291	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0,075	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0,000	Signifikan
Kadar 1,25%	Tanpa sel	0,002	Signifikan
	Kadar 0,625%	0,001	Tidak signifikan
	Kadar 0,3125%	1,000	Tidak signifikan
	Kontrol negatif	0,978	Tidak signifikan
Kadar 0,625%	Kontrol positif	0,001	Signifikan
	Tanpa sel	0,000	Signifikan
	Kadar 0,3125%	0,001	Signifikan
	Kontrol negatif	0,004	Signifikan
Kadar 0,3125%	Kontrol positif	1,000	Tidak Signifikan
	Tanpa sel	0,000	Signifikan
	Kontrol negatif	0,990	Tidak signifikan
	Kontrol positif	0,001	Signifikan
Kontrol negatif	Tanpa sel	0,000	Signifikan
	Kontrol positif	0,006	Signifikan
	Tanpa sel	0,000	Signifikan
Kontrol positif	Tanpa sel	0,000	Signifikan

Tabel Tukey di atas merupakan hasil absorbansi pada waktu inkubasi 48 jam, tampak bahwa ada perbedaan yang signifikan antara levamisol dengan semua perlakuan seri kadar jus kacang hijau kecuali kadar 0,625%. Sedangkan kontrol negatifnya hanya berbeda signifikan pada kadar 0,625% begitu juga dengan tanpa sel. Berarti pemberian jus kacang hijau pada kadar 0,625% mempengaruhi produksi antibodi.

Dari dua tabel Tukey di atas antara waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam dapat disimpulkan bahwa kontrol positif yaitu levamisol tidak berbeda signifikan dengan kadar 0,625% pada waktu inkubasi 48 jam, sedangkan pada inkubasi 24 jam ada perbedaan yang signifikan.

E. Penghitungan sel dengan mikroskop

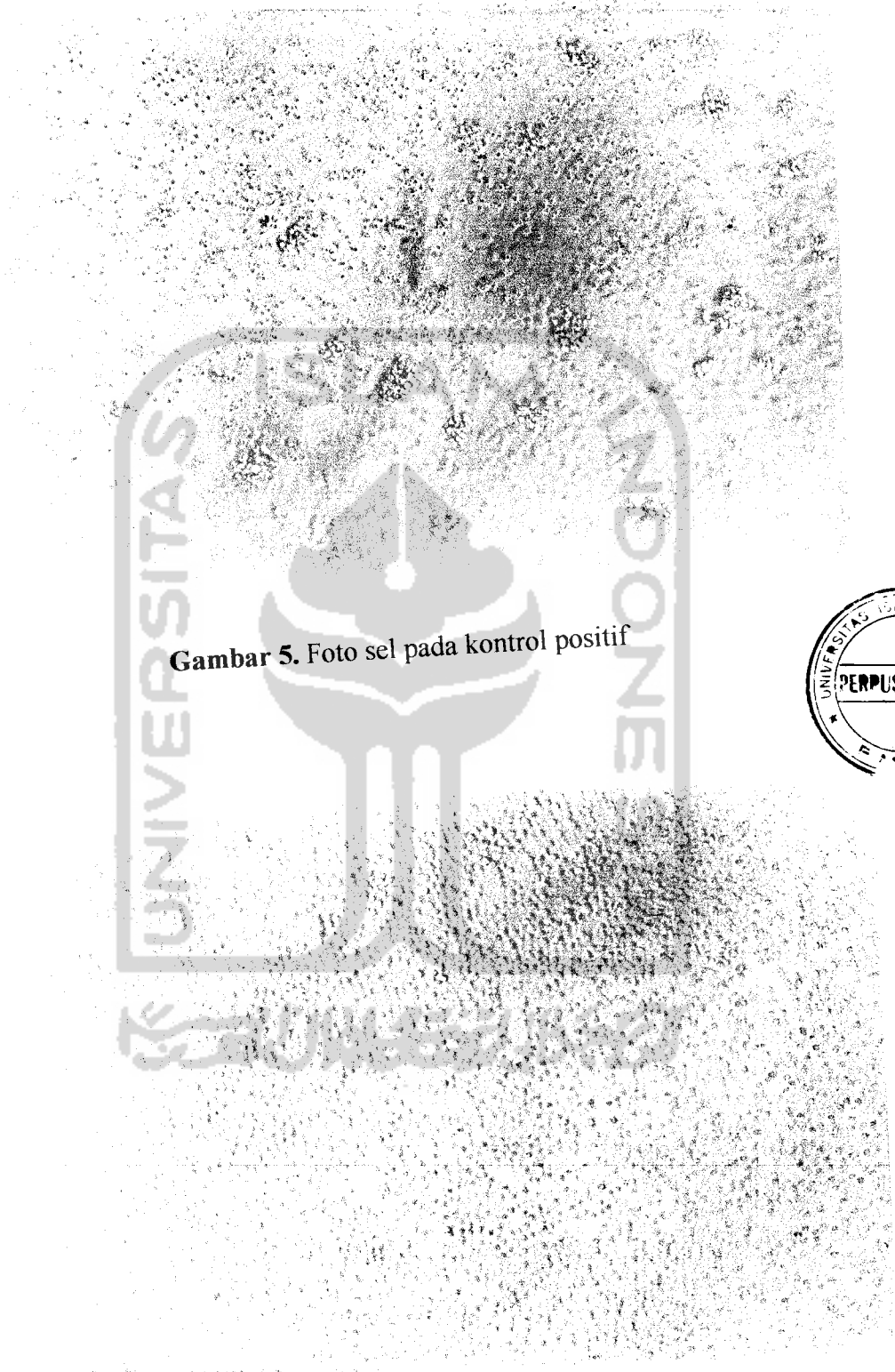
Sel disuspensikan dengan cara disedot dan dikeluarkan lagi agar sel teraduk secara merata lalu ditambah zat warna yaitu triplan blue diaduk kembali kemudian ambil sebanyak 10 μ l masukkan ke hemositometer dan dihitung banyaknya sel dengan mikroskop.

Data rata-rata penghitungan sel yang diperoleh adalah sebagai berikut:

Tabel VII. Hasil rata-rata penghitungan sel dengan mikroskop

kelompok	Inkubasi 24 jam	Inkubasi 48 jam
Kadar 5 %	397000	420000
Kadar 2,5%	300000	302500
Kadar 1,25%	332500	377500
Kadar 0,625%	440000	467000
Kadar 0,3125%	367500	370000
Kontrol negatif	152500	262500
Kontrol positif	535000	607500

Dari data di atas dapat dilihat pada perlakuan dengan jus kacang hijau jumlah sel terbanyak pada kadar 0,6125%, selain kontrol positif. Sedangkan untuk kontrol negatif, jumlah selnya paling sedikit. Data ini hanya sebagai pendukung metode MTT, bahwa pengukuran proliferasi limfosit dengan metode MTT sudah dapat mewakili bila dibanding dengan menghitung dengan mikroskop.



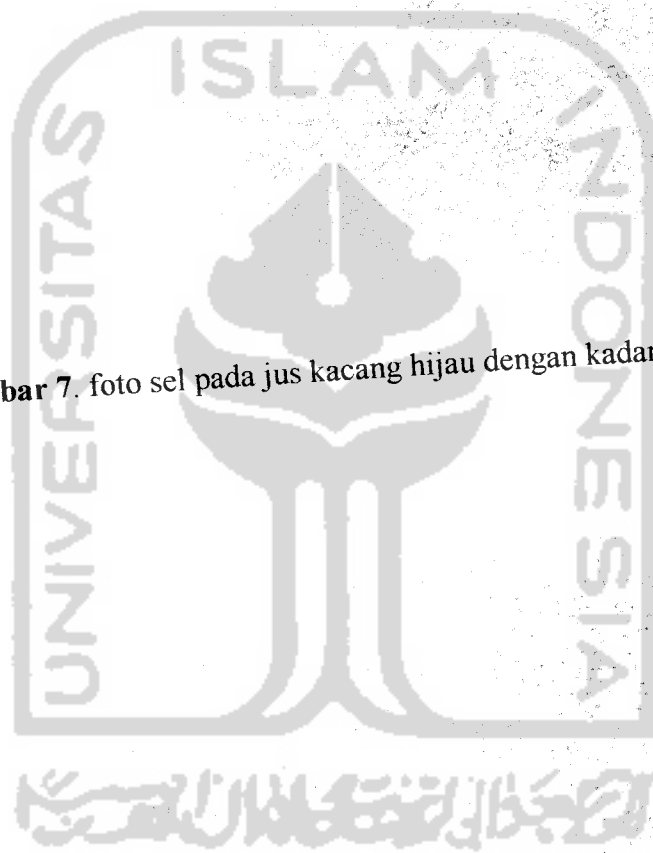
Gambar 5. Foto sel pada kontrol positif



Gambar 6. foto sel pada kontrol negatif

Gambar 9

Gambar 7. foto sel pada jus kacang hijau dengan kadar 5%



Gambar 10. 1

Gambar 8. foto sel pada jus kacang hijau dengan kadar 2,5%

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2003^a, *About hepatitis*, available at <http://www.abouthepatitis.com>
- Anonim, 2003^b, *Protocols MTT assay*, available at <file:///A:\MTT Assay.htm>
- Anonim, 2004^a, *Kacang Hijau*, available at <http://www.google.com>
- Anonim, 2004^b, *Manfaat Kacang Hijau untuk kesehatan*, available at <http://www.google.com>
- Baratawidjaja, K.G., 2000, *Imunologi Dasar*, Edisi IV, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
- Burgess, G.W., 1995, *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*, diterjemahkan oleh Wayan T Artama, Gadjah Mada University, Jogjakarta
- Case, C.L., Funke, B.R., Tortora, G.J., 2001, *Microbiology An Introduction*, 7th Ed., Addison Wesley Longman, Inc., San Francisco, 337, 476-482, 484, 513-516
- Evelyn, C.P., 1999, *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*, Penerbit PT Gramedia, Jakarta, 166
- Fike, D.J., 1997, *Cells and Tissues of the Immun System dalam Sheehan, C., Immunology Principles and Laboratory Diagnosis*, 2nd Ed., Lippincott Company, Philadelphia, 9-11, 16
- Guyton, Arthur C. M. D., 1996, *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*, Edisi ketujuh, Bagian pertama, EGC, Jakarta
- Kresno, Siti Boedina, 2001, *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Edisi keempat, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
- Krisnawati, I., 2003, *Khasiat Makanan-Minuman Pilihan*, dikutip dari Nirmala, PT Narya Gunatra, Jakarta
- Rantam, F.A., 2003, *Metode Imunologi*, Cet. I, Airlangga University Press, Surabaya
- Robbins dan Kumar, 1995, *Buku Ajar Patologi I*, Edisi IV, EGC, Jakarta
- Roit, Ivan, 2003, *Imunologi*, Edisi VIII, diterjemahkan Alida Harahap, Penerbit Widya Medika, Jakarta

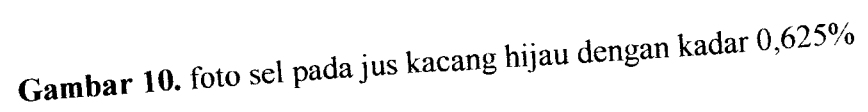


- Sardjoko, 1991, *Bioteknologi Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 147, 148, 152
- Soeprapto, H.S., 2004, *Bertanam Kacang Hijau*, Cet. XV, Penebar Swadaya, Jakarta, 4-6, 7-8, 10
- Spencer, T.L., 1995, Pemblok, Pengencer dan Reaksi ELISA yang menyimpang, dalam Burgess, G.W., *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*, diterjemahkan oleh Wayan T Amarta, Gajah Mada University, Jogjakarta, 96, 110
- Widmann, K.F., 1995, *Tinjauan Klinis atas Hasil Pemeriksaan Laboratorium*, diterjemahkan oleh Siti Boedina Kresno, Edisi IX, EGC, Jakarta
- Wirakusumah, E.S., 2003, *Buah dan Sayur untuk Terapi*, PT Penebar Swadaya, Jakarta





Gambar 9. foto sel pada jus kacang hijau dengan kadar 1,25%



Gambar 10. foto sel pada jus kacang hijau dengan kadar 0,625%

A grayscale micrograph showing a dense field of small, dark, irregularly shaped particles, likely cells, suspended in a lighter fluid. The particles are distributed throughout the frame, with a higher concentration in the upper right quadrant. A faint watermark of a university logo is visible in the background.

Gambar 11. foto sel pada jus kacang hijau dengan kadar 0,3125%

Gambar 12. foto tanpa penambahan sel

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Jus kacang hijau pada kadar 0,625% mampu secara optimal meningkatkan respon imun limfosit dengan meningkatkan proliferasi sel dan produksi antibodi.
2. Jus kacang hijau mempunyai aktivitas sebagai imunostimulan.
3. Jus kacang hijau lebih berperan sebagai respon imun humoral.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian serupa secara *in vivo*.
2. Perlu dilakukan fraksinasi dan identifikasi kandungan jus kacang hijau yang aktif sebagai imunostimulan.

Lampiran 1. penghitungan jus kacang hijau yang akan dimasukkan pada plate

$$\begin{aligned} 5\% &= 8 \text{ well} \times 100 \mu\text{l} = 800 \mu\text{l} \times 2 = 1600\mu\text{l} \\ 2,5\% &= 2,5/5 \times 1600 \mu\text{l} = 800 \text{ (jus)} + 800 \text{ (medium)} = 1600 \mu\text{l} \\ 1,25\% &= 1,25/5 \times 1600 \mu\text{l} = 400 \text{ (jus)} + 1200 \text{ (medium)} = 1600 \mu\text{l} \\ 0,625\% &= 0,625/5 \times 1600 \mu\text{l} = 200 \text{ (jus)} + 1400 \text{ (medium)} = 1600 \mu\text{l} \\ 0,3125\% &= 0,3125/5 \times 1600 \mu\text{l} = 100 \text{ (jus)} + 1500 \text{ (medium)} = 1600 \mu\text{l} \end{aligned}$$



Lampiran 3. penghitungan dosis levamisol

Pada manusia:

Tablet isi 25 mg \longrightarrow 25 ml

Sehingga kadar = $29,46/25 = 1,1784$ mg/ml

Dosis pemberian = $2,5$ mg/kg x 70 kg = 175 mg

Pada mencit :

175 mg x $0,0026 = 0,455$ mg/20 g BB ($19,3$ ml/kgBB)

sehingga dosis yang diberikan = $(0,455\text{mg} / 20\text{g}) : 1,1784\text{mg/ml} = 0,386\text{ml}/20\text{g}$

pembuatan levamisol dan penghitungan kadar :

$1,1784\text{mg/ml} \longrightarrow 1,17\text{g}/10\text{ml}$ (100x pengenceran) = $0,117$ g/ml

serbuk levamisol yang dimiliki = $2,12$ g

maka dibagi 2 yaitu untuk medium dan aquades

$1,06\text{g}/1,17 \times 10\text{ml} = 9,05$ ml	\longrightarrow	kadar $1,06\text{g}$
ambil 5ml ad 10 ml	\longrightarrow	kadar $0,53\text{g}$
ambil 5ml ad 10 ml	\longrightarrow	kadar $0,265\text{g}$
ambil 5ml ad 10 ml	\longrightarrow	kadar $0,1325\text{g}$
ambil 5ml ad 10 ml	\longrightarrow	kadar $0,06625\text{g}$
ambil 5ml ad 10 ml	\longrightarrow	kadar $0,033125\text{g}$

Lampiran 4. komposisi larutan untuk ELISA

- PBS : 10mM buffer phospat pH 7,4
150mM NaCl
0,1% Na-Acide
 - Larutan PBST 20 0,05% : - larutan PBS
- Tween20 0,05g dalam 100ml larutan yang dipakai
 - Larutan substrat OPD : citric acid = 1,16g
Na₂HPO₄ = 1,8g
Aquadess = 250ml
- Pemakaian :
- Buffer = 50ml
 - OPD = 20mg
 - 30% H₂O₂ = 10μl
- Buffer karbonat.bikarbonat (prosedur coating)
NaHCO₃ = 2,93 g
NaCO₃ = 1,59 g
Dalam 1 L aquades + 0,02% Na. Acide
PH 9,6

Lampiran 5. untuk kultur sel

➤ Medium RPMI

RPMI =10,4g

NaHCO₃ =2g

Hepes =2,86g

Aquadex =1L

➤ Medium Komplit

Med. RPMI =100ml

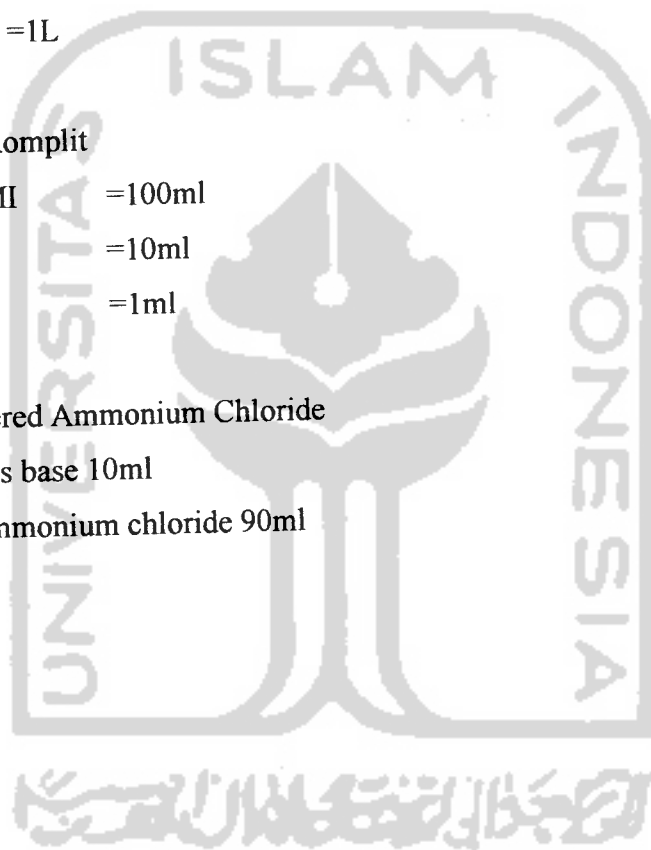
FBS =10ml

Pen-strep =1ml

➤ Tris Buffered Ammonium Chloride

0,17 M tris base 10ml

0,16 M ammonium chloride 90ml



Lampiran 6. tabel statistik pengukuran proliferasi limfosit pada inkubasi 24 jam

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
DOSIS	24	4,50000	2,340568	1,000	8,000
ABSORBAN	24	,42792	,182527	,037	,791

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		DOSIS	ABSORBAN
N		24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,50000	,42792
	Std. Deviation	2,340569	,182527
Most Extreme Differences	Absolute	,114	,248
	Positive	,114	,130
	Negative	-,114	-,248
Kolmogorov-Smirnov Z		,559	1,217
Asymp. Sig. (2-tailed)		,913	,103

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

ABSORBAN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
kadar 5%	3	,42667	,070088	,040465	,25256	,60078	,378	,507
kadar 2,5%	3	,46800	,037162	,021455	,37568	,56032	,433	,507
kadar 1,25%	3	,47333	,072886	,042081	,29228	,65439	,410	,553
kadar 0,625%	3	,72900	,080517	,046487	,52898	,92902	,638	,791
kadar 0,312%	3	,48300	,062482	,036074	,32779	,63821	,443	,555
kontrol negatif	3	,37567	,005774	,003333	,36132	,39001	,369	,379
kontrol positif	3	,41433	,004509	,002603	,40313	,42553	,410	,419
tanpa sel	3	,05333	,014572	,008413	,01714	,08953	,037	,065
Total	24	,42792	,182527	,037258	,35084	,50499	,037	,791

Test of Homogeneity of Variances

ABSORBAN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,965	7	16	,011

ANOVA

ABSORBAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,722	7	,103	37,058	,000
Within Groups	,045	16	,003		
Total	,766	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ABSORBAN

Tukey HSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 5%	kadar 2,5%	-,04133	,043068	,974	-,19044	,10778
	kadar 1,25%	-,04667	,043068	,951	-,19578	,10244
	kadar 0,625%	-,30233*	,043068	,000	-,45144	-,15322
	kadar 0,3125%	-,05633	,043068	,883	-,20544	,09278
	kontrol negatif	,05100	,043068	,925	-,09811	,20011
	kontrol positif	,01233	,043068	1,000	-,13678	,16144
	tanpa sel	,37333*	,043068	,000	,22422	,52244
kadar 2,5%	kadar 5%	,04133	,043068	,974	-,10778	,19044
	kadar 1,25%	-,00533	,043068	1,000	-,15444	,14378
	kadar 0,625%	-,26100*	,043068	,000	-,41011	-,11189
	kadar 0,3125%	-,01500	,043068	1,000	-,16411	,13411
	kontrol negatif	,09233	,043068	,430	-,05678	,24144
	kontrol positif	,05367	,043068	,906	-,09544	,20278
	tanpa sel	,41467*	,043068	,000	,26556	,56378
kadar 1,25%	kadar 5%	,04667	,043068	,951	-,10244	,19578
	kadar 2,5%	,00533	,043068	1,000	-,14378	,15444
	kadar 0,625%	-,25567*	,043068	,000	-,40478	-,10656
	kadar 0,3125%	-,00967	,043068	1,000	-,15878	,13944
	kontrol negatif	,09767	,043068	,366	-,05144	,24678
	kontrol positif	,05900	,043068	,858	-,09011	,20811
	tanpa sel	,42000*	,043068	,000	,27089	,56911
kadar 0,625%	kadar 5%	,30233*	,043068	,000	,15322	,45144
	kadar 2,5%	,26100*	,043068	,000	,11189	,41011
	kadar 1,25%	,25567*	,043068	,000	,10656	,40478
	kadar 0,3125%	,24600*	,043068	,001	,09689	,39511
	kontrol negatif	,35333*	,043068	,000	,20422	,50244
	kontrol positif	,31467*	,043068	,000	,16556	,46378
	tanpa sel	,67567*	,043068	,000	,52656	,82478
kadar 0,3125%	kadar 5%	,05633	,043068	,883	-,09278	,20544
	kadar 2,5%	,01500	,043068	1,000	-,13411	,16411
	kadar 1,25%	,00967	,043068	1,000	-,13944	,15878
	kadar 0,625%	-,24600*	,043068	,001	-,39511	-,09689
	kontrol negatif	,10733	,043068	,265	-,04178	,25644
	kontrol positif	,06867	,043068	,747	-,08044	,21778
	tanpa sel	,42967*	,043068	,000	,28056	,57878
kontrol negatif	kadar 5%	-,05100	,043068	,925	-,20011	,09811
	kadar 2,5%	-,09233	,043068	,430	-,24144	,05678
	kadar 1,25%	-,09767	,043068	,366	-,24678	,05144
	kadar 0,625%	-,35333*	,043068	,000	-,50244	-,20422
	kadar 0,3125%	-,10733	,043068	,265	-,25644	,04178
	kontrol positif	-,03867	,043068	,982	-,18778	,11044
	tanpa sel	,32233*	,043068	,000	,17322	,47144
kontrol positif	kadar 5%	-,01233	,043068	1,000	-,16144	,13678
	kadar 2,5%	-,05367	,043068	,906	-,20278	,09544
	kadar 1,25%	-,05900	,043068	,858	-,20811	,09011
	kadar 0,625%	-,31467*	,043068	,000	-,46378	-,16556
	kadar 0,3125%	-,06867	,043068	,747	-,21778	,08044
	kontrol negatif	,03867	,043068	,982	-,11044	,18778
	tanpa sel	,36100*	,043068	,000	,21189	,51011
tanpa sel	kadar 5%	-,37333*	,043068	,000	-,52244	-,22422
	kadar 2,5%	-,41467*	,043068	,000	-,56378	-,26556
	kadar 1,25%	-,42000*	,043068	,000	-,56911	-,27089
	kadar 0,625%	-,67567*	,043068	,000	-,82478	-,52656
	kadar 0,3125%	-,42967*	,043068	,000	-,57878	-,28056
	kontrol negatif	-,32233*	,043068	,000	-,47144	-,17322
	kontrol positif	-,36100*	,043068	,000	-,51011	-,21189

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

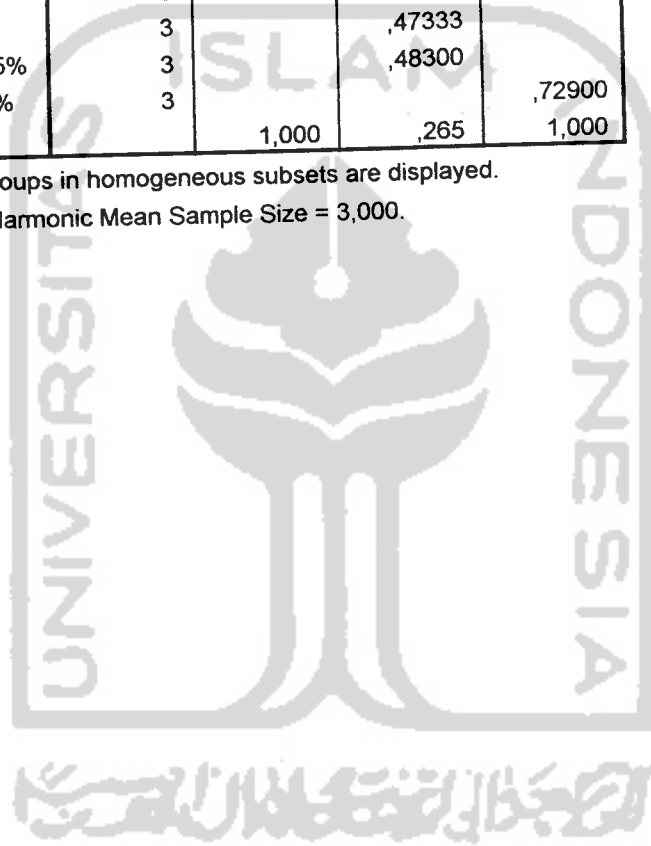
ABSORBAN

Tukey HSD^a

DOSIS	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tanpa sel	3	,05333		
kontrol negatif	3		,37567	
kontrol positif	3		,41433	
kadar 5%	3		,42667	
kadar 2,5%	3		,46800	
kadar 1,25%	3		,47333	
kadar 0,3125%	3		,48300	
kadar 0,625%	3			,72900
Sig.		1,000	,265	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 7. tabel statistik pengukuran proliferasi limfosit pada inkubasi 48 jam

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smimov Test

		DOSIS	ABSORBAN
N		24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,50000	,61721
	Std. Deviation	2,340569	,404384
Most Extreme Differences	Absolute	,114	,260
	Positive	,114	,260
	Negative	-,114	-,198
Kolmogorov-Smimov Z		,559	1,276
Asymp. Sig. (2-tailed)		,913	,077

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



Oneway

Descriptives

ABSORBAN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean	Mean		
kadar 5%	3	,54000	,017436	,010066	,49669	,58331	,528	,560
kadar 2,5%	3	,53267	,008021	,004631	,51274	,55259	,525	,541
kadar 1,25%	3	,55933	,093061	,053729	,32816	,79051	,483	,663
kadar 0,625%	3	,69833	,038631	,022303	,60237	,79430	,658	,735
kadar 0,312%	3	,54433	,077203	,044573	,35255	,73612	,492	,633
kontrol negatif	3	,45433	,035275	,020366	,36671	,54196	,432	,495
kontrol positif	3	,54967	,089768	,051828	,132667	,177266	1,448	1,618
tanpa sel	3	,05900	,029052	,016773	-,01317	,13117	,031	,089
Total	24	,61721	,404384	,082545	,44645	,78796	,031	1,618

Test of Homogeneity of Variances

ABSORBAN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,645	7	16	,015

ANOVA

ABSORBAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,708	7	,530	159,139	,000
Within Groups	,053	16	,003		
Total	3,761	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ABSORBAN

Tukey HSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 5%	kadar 2,5%	,00733	,047106	1,000	-,15576	,17042
	kadar 1,25%	-,01933	,047106	1,000	-,18242	,14376
	kadar 0,625%	-,15833	,047106	,060	-,32142	,00476
	kadar 0,3125%	-,00433	,047106	1,000	-,16742	,15876
	kontrol negatif	,08567	,047106	,618	-,07742	,24876
	kontrol positif	-1,00967*	,047106	,000	-1,17276	-,84658
	tanpa sel	,48100*	,047106	,000	,31791	,64409
kadar 2,5%	kadar 5%	-,00733	,047106	1,000	-,17042	,15576
	kadar 1,25%	-,02667	,047106	,999	-,18976	,13642
	kadar 0,625%	-,16567*	,047106	,045	-,32876	-,00258
	kadar 0,3125%	-,01167	,047106	1,000	-,17476	,15142
	kontrol negatif	,07833	,047106	,709	-,08476	,24142
	kontrol positif	-1,01700*	,047106	,000	-1,18009	-,85391
	tanpa sel	,47367*	,047106	,000	,31058	,63676
kadar 1,25%	kadar 5%	,01933	,047106	1,000	-,14376	,18242
	kadar 2,5%	,02667	,047106	,999	-,13642	,18976
	kadar 0,625%	-,13900	,047106	,126	-,30209	,02409
	kadar 0,3125%	,01500	,047106	1,000	-,14809	,17809
	kontrol negatif	,10500	,047106	,385	-,05809	,26809
	kontrol positif	-,99033*	,047106	,000	-1,15342	-,82724
	tanpa sel	,50033*	,047106	,000	,33724	,66342
kadar 0,625%	kadar 5%	,15833	,047106	,060	-,00476	,32142
	kadar 2,5%	,16567*	,047106	,045	,00258	,32876
	kadar 1,25%	,13900	,047106	,126	-,02409	,30209
	kadar 0,3125%	,15400	,047106	,071	-,00909	,31709
	kontrol negatif	,24400*	,047106	,002	,08091	,40709
	kontrol positif	-,85133*	,047106	,000	-1,01442	-,68824
	tanpa sel	,63933*	,047106	,000	,47624	,80242
kadar 0,3125%	kadar 5%	,00433	,047106	1,000	-,15876	,16742
	kadar 2,5%	,01167	,047106	1,000	-,15142	,17476
	kadar 1,25%	-,01500	,047106	1,000	-,17809	,14809
	kadar 0,625%	-,15400	,047106	,071	-,31709	,00909
	kontrol negatif	,09000	,047106	,563	-,07309	,25309
	kontrol positif	-1,00533*	,047106	,000	-1,16842	-,84224
	tanpa sel	,48533*	,047106	,000	,32224	,64842
kontrol negatif	kadar 5%	-,08567	,047106	,618	-,24876	,07742
	kadar 2,5%	-,07833	,047106	,709	-,24142	,08476
	kadar 1,25%	-,10500	,047106	,385	-,26809	,05809
	kadar 0,625%	-,24400*	,047106	,002	-,40709	-,08091
	kadar 0,3125%	-,09000	,047106	,563	-,25309	,07309
	kontrol positif	-1,09533*	,047106	,000	-1,25842	-,93224
	tanpa sel	,39533*	,047106	,000	,23224	,55842
kontrol positif	kadar 5%	1,00967*	,047106	,000	,84658	1,17276
	kadar 2,5%	1,01700*	,047106	,000	,85391	1,18009
	kadar 1,25%	,99033*	,047106	,000	,82724	1,15342
	kadar 0,625%	,85133*	,047106	,000	,68824	1,01442
	kadar 0,3125%	1,00533*	,047106	,000	,84224	1,16842
	kontrol negatif	1,09533*	,047106	,000	,93224	1,25842
	tanpa sel	1,49067*	,047106	,000	1,32758	1,65376
tanpa sel	kadar 5%	-,48100*	,047106	,000	-,64409	-,31791
	kadar 2,5%	-,47367*	,047106	,000	-,63676	-,31058
	kadar 1,25%	-,50033*	,047106	,000	-,66342	-,33724
	kadar 0,625%	-,63933*	,047106	,000	-,80242	-,47624
	kadar 0,3125%	-,48533*	,047106	,000	-,64842	-,32224
	kontrol negatif	-,39533*	,047106	,000	-,55842	-,23224
	kontrol positif	-1,49067*	,047106	,000	-1,65376	-1,32758

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

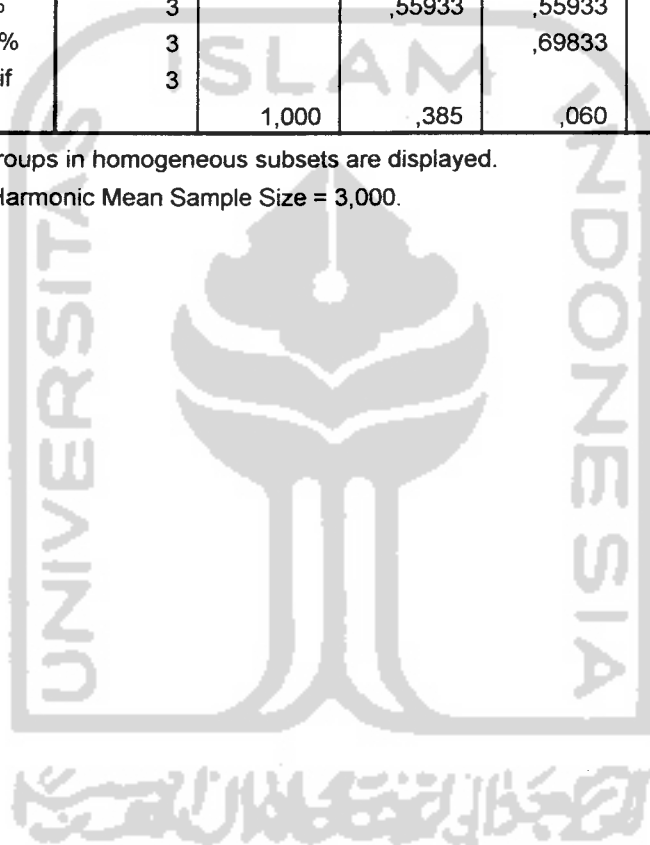
ABSORBAN

Tukey HSD^a

DOSIS	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
tanpa sel	3	,05900			
kontrol negatif	3		,45433		
kadar 2,5%	3		,53267		
kadar 5%	3		,54000	,54000	
kadar 0,3125%	3		,54433	,54433	
kadar 1,25%	3		,55933	,55933	
kadar 0,625%	3			,69833	
kontrol positif	3				1,54967
Sig.		1,000	,385	,060	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 8. tabel statistik pengukuran produksi antibodi pada inkubasi 24 jam

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		DOSIS	ABSORBAN
N		24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,50000	,17125
	Std. Deviation	2,340569	,088275
Most Extreme Differences	Absolute	,114	,212
	Positive	,114	,212
	Negative	-,114	-,199
Kolmogorov-Smirnov Z		,559	1,039
Asymp. Sig. (2-tailed)		,913	,231

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



Oneway

Descriptives

ABSORBAN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kadar 5%	3	,17033	,020429	011795	,11959	,22108	,147	,185
kadar 2,5%	3	,14267	,011504	006642	,11409	,17124	,131	,154
kadar 1,25%	3	,14100	,010583	006110	,11471	,16729	,133	,153
kadar 0,625%	3	,19767	,033081	019099	,11549	,27984	,172	,235
kadar 0,312%	3	,15500	,008544	004933	,13378	,17622	,146	,163
kontrol ngtf	3	,18667	,021595	012468	,13302	,24031	,164	,207
kontrol pstf	3	,35233	,036556	021106	,26152	,44314	,317	,390
tanpa sel	3	,02433	,004509	002603	,01313	,03553	,020	,029
Total	24	,17125	,088275	018019	,13397	,20853	,020	,390

Test of Homogeneity of Variances

ABSORBAN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,091	7	16	,105

ANOVA

ABSORBAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,172	7	,025	53,802	,000
Within Groups	,007	16	,000		
Total	,179	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ABSORBAN
Tukey HSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 5%	kadar 2,5%	,02767	,017445	,752	-,03273	,08806
	kadar 1,25%	,02933	,017445	,698	-,03106	,08973
	kadar 0,625%	-,02733	,017445	,762	-,08773	,03306
	kadar 0,3125%	,01533	,017445	,984	-,04506	,07573
	kontrol ngtf	-,01633	,017445	,977	-,07673	,04406
	kontrol pstf	-,18200*	,017445	,000	-,24240	-,12160
	tanpa sel	,14600*	,017445	,000	,08560	,20640
kadar 2,5%	kadar 5%	-,02767	,017445	,752	-,08806	,03273
	kadar 1,25%	-,00167	,017445	1,000	-,05873	,06206
	kadar 0,625%	-,05500	,017445	,088	-,11540	,00540
	kadar 0,3125%	-,01233	,017445	,996	-,07273	,04806
	kontrol ngtf	-,04400	,017445	,254	-,10440	,01640
	kontrol pstf	-,20967*	,017445	,000	-,27006	-,14927
	tanpa sel	,11833*	,017445	,000	,05794	,17873
kadar 1,25%	kadar 5%	-,02933	,017445	,698	-,08973	,03106
	kadar 2,5%	-,00167	,017445	1,000	-,06206	,05873
	kadar 0,625%	-,05667	,017445	,074	-,11706	,00373
	kadar 0,3125%	-,01400	,017445	,990	-,07440	,04640
	kontrol ngtf	-,04567	,017445	,219	-,10606	,01473
	kontrol pstf	-,21133*	,017445	,000	-,27173	-,15094
	tanpa sel	,11667*	,017445	,000	,05627	,17706
kadar 0,625%	kadar 5%	,02733	,017445	,762	-,03306	,08773
	kadar 2,5%	,05500	,017445	,088	-,00540	,11540
	kadar 1,25%	,05667	,017445	,074	-,00373	,11706
	kadar 0,3125%	,04267	,017445	,284	-,01773	,10306
	kontrol ngtf	,01100	,017445	,998	-,04940	,07140
	kontrol pstf	-,15467*	,017445	,000	-,21506	-,09427
	tanpa sel	,17333*	,017445	,000	,11294	,23373
kadar 0,3125%	kadar 5%	-,01533	,017445	,984	-,07573	,04506
	kadar 2,5%	,01233	,017445	,996	-,04806	,07273
	kadar 1,25%	,01400	,017445	,990	-,04640	,07440
	kadar 0,625%	-,04267	,017445	,284	-,10306	,01773
	kontrol ngtf	-,03167	,017445	,620	-,09206	,02873
	kontrol pstf	-,19733*	,017445	,000	-,25773	-,13694
	tanpa sel	,13067*	,017445	,000	,07027	,19106
kontrol ngtf	kadar 5%	,01633	,017445	,977	-,04406	,07673
	kadar 2,5%	,04400	,017445	,254	-,01640	,10440
	kadar 1,25%	,04567	,017445	,219	-,01473	,10606
	kadar 0,625%	-,01100	,017445	,998	-,07140	,04940
	kadar 0,3125%	,03167	,017445	,620	-,02873	,09206
	kontrol pstf	-,16567*	,017445	,000	-,22606	-,10527
	tanpa sel	,16233*	,017445	,000	,10194	,22273
kontrol pstf	kadar 5%	,18200*	,017445	,000	,12160	,24240
	kadar 2,5%	,20967*	,017445	,000	,14927	,27006
	kadar 1,25%	,21133*	,017445	,000	,15094	,27173
	kadar 0,625%	,15467*	,017445	,000	,09427	,21506
	kadar 0,3125%	,19733*	,017445	,000	,13694	,25773
	kontrol ngtf	,16567*	,017445	,000	,10527	,22606
	tanpa sel	,32800*	,017445	,000	,26760	,38840
tanpa sel	kadar 5%	-,14600*	,017445	,000	-,20640	-,08560
	kadar 2,5%	-,11833*	,017445	,000	-,17873	-,05794
	kadar 1,25%	-,11667*	,017445	,000	-,17706	-,05627
	kadar 0,625%	-,17333*	,017445	,000	-,23373	-,11294
	kadar 0,3125%	-,13067*	,017445	,000	-,19106	-,07027
	kontrol ngtf	-,16233*	,017445	,000	-,22273	-,10194
	kontrol pstf	-,32800*	,017445	,000	-,38840	-,26760

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

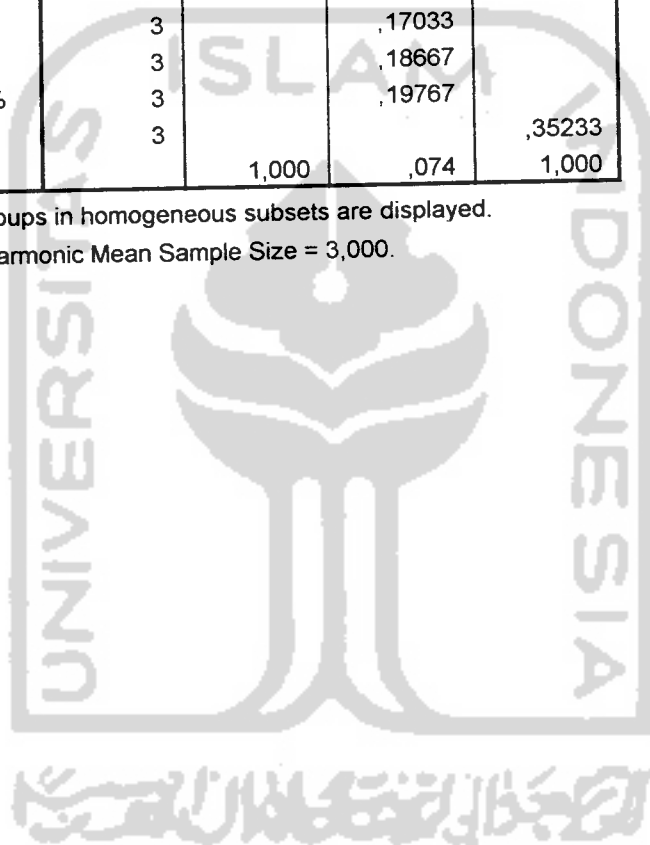
ABSORBAN

Tukey HSD^a

DOSIS	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tanpa sel	3	,02433		
kadar 1,25%	3		,14100	
kadar 2,5%	3		,14267	
kadar 0,3125%	3		,15500	
kadar 5%	3		,17033	
kontrol ngtf	3		,18667	
kadar 0,625%	3		,19767	
kontrol pstf	3			,35233
Sig.		1,000	,074	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Oneway

Descriptives

ABSORBAN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean	Mean		
					Lower Bound	Upper Bound		
kadar 5%	3	,13867	,012583	,007265	,10741	,16992	,127	,152
kadar 2,5%	3	,14000	,035763	,020648	,05116	,22884	,102	,173
kadar 1,25%	3	,17900	,025515	,014731	,11562	,24238	,154	,205
kadar 0,625%	3	,27433	,027227	,015720	,20670	,34197	,253	,305
kadar 0,312%	3	,18100	,020664	,011930	,12967	,23233	,164	,204
kontrol ngtf	3	,19467	,008145	,004702	,17443	,21490	,189	,204
kontrol psf	3	,27100	,006083	,003512	,25589	,28611	,264	,275
tanpa sel	3	,05300	,007550	,004359	,03425	,07175	,046	,061
Total	24	,17896	,071418	,014578	,14880	,20912	,046	,305

Test of Homogeneity of Variances

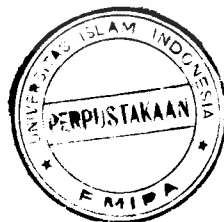
ABSORBAN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,877	7	16	,141

ANOVA

ABSORBAN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,110	7	,016	36,950	,000
Within Groups	,007	16	,000		
Total	,117	23			



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ABSORBAN

Tukey HSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 5%	kadar 2,5%	-.00133	,016875	1,000	-.05976	,05709
	kadar 1,25%	-.04033	,016875	,308	-.09876	,01809
	kadar 0,625%	-.13567*	,016875	,000	-.19409	-.07724
	kadar 0,3125%	-.04233	,016875	,259	-.10076	,01609
	kontrol ngtf	-.05600	,016875	,065	-.11442	,00242
	kontrol pstf	-.13233*	,016875	,000	-.19076	-.07391
	tanpa sel	,08567*	,016875	,002	,02724	,14409
kadar 2,5%	kadar 5%	,00133	,016875	1,000	-.05709	,09876
	kadar 1,25%	-.03900	,016875	,345	-.09742	,01942
	kadar 0,625%	-.13433*	,016875	,000	-.19276	-.07591
	kadar 0,3125%	-.04100	,016875	,291	-.09942	,01742
	kontrol ngtf	-.05467	,016875	,075	-.11309	,00376
	kontrol pstf	-.13100*	,016875	,000	-.18942	-.07258
	tanpa sel	,08700*	,016875	,002	,02858	,14542
kadar 1,25%	kadar 5%	,04033	,016875	,308	-.01809	,09876
	kadar 2,5%	,03900	,016875	,345	-.01942	,09742
	kadar 0,625%	-.09533*	,016875	,001	-.15376	-.03691
	kadar 0,3125%	-.00200	,016875	1,000	-.06042	,05642
	kontrol ngtf	-.01567	,016875	,978	-.07409	,04276
	kontrol pstf	-.09200*	,016875	,001	-.15042	-.03358
	tanpa sel	,12600*	,016875	,000	,06758	,18442
kadar 0,625%	kadar 5%	,13567*	,016875	,000	,07724	,19409
	kadar 2,5%	,13433*	,016875	,000	,07591	,19276
	kadar 1,25%	,09533*	,016875	,001	,03691	,15376
	kadar 0,3125%	,09333*	,016875	,001	,03491	,15176
	kontrol ngtf	,07967*	,016875	,004	,02124	,13809
	kontrol pstf	,00333	,016875	1,000	-.05509	,06176
	tanpa sel	,22133*	,016875	,000	,16291	,27976
kadar 0,3125%	kadar 5%	,04233	,016875	,259	-.01609	,10076
	kadar 2,5%	,04100	,016875	,291	-.01742	,09942
	kadar 1,25%	,00200	,016875	1,000	-.05642	,06042
	kadar 0,625%	-.09333*	,016875	,001	-.15176	-.03491
	kontrol ngtf	-.01367	,016875	,990	-.07209	,04476
	kontrol pstf	-.09000*	,016875	,001	-.14842	-.03158
	tanpa sel	,12800*	,016875	,000	,06958	,18642
kontrol ngtf	kadar 5%	,05600	,016875	,065	-.00242	,11442
	kadar 2,5%	,05467	,016875	,075	-.00376	,11309
	kadar 1,25%	,01567	,016875	,978	-.04276	,07409
	kadar 0,625%	-.07967*	,016875	,004	-.13809	-.02124
	kadar 0,3125%	,01367	,016875	,990	-.04476	,07209
	kontrol pstf	-.07633*	,016875	,006	-.13476	-.01791
	tanpa sel	,14167*	,016875	,000	,08324	,20009
kontrol pstf	kadar 5%	,13233*	,016875	,000	,07391	,19076
	kadar 2,5%	,13100*	,016875	,000	,07258	,18942
	kadar 1,25%	,09200*	,016875	,001	,03358	,15042
	kadar 0,625%	-.00333	,016875	1,000	-.06176	,05509
	kadar 0,3125%	,09000*	,016875	,001	,03158	,14842
	kontrol ngtf	,07633*	,016875	,006	,01791	,13476
	tanpa sel	,21800*	,016875	,000	,15958	,27642
tanpa sel	kadar 5%	-.08567*	,016875	,002	-.14409	-.02724
	kadar 2,5%	-.08700*	,016875	,002	-.14542	-.02858
	kadar 1,25%	-.12600*	,016875	,000	-.18442	-.06758
	kadar 0,625%	-.22133*	,016875	,000	-.27976	-.16291
	kadar 0,3125%	-.12800*	,016875	,000	-.18642	-.06958
	kontrol ngtf	-.14167*	,016875	,000	-.20009	-.08324
	kontrol pstf	-.21800*	,016875	,000	-.27642	-.15958

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

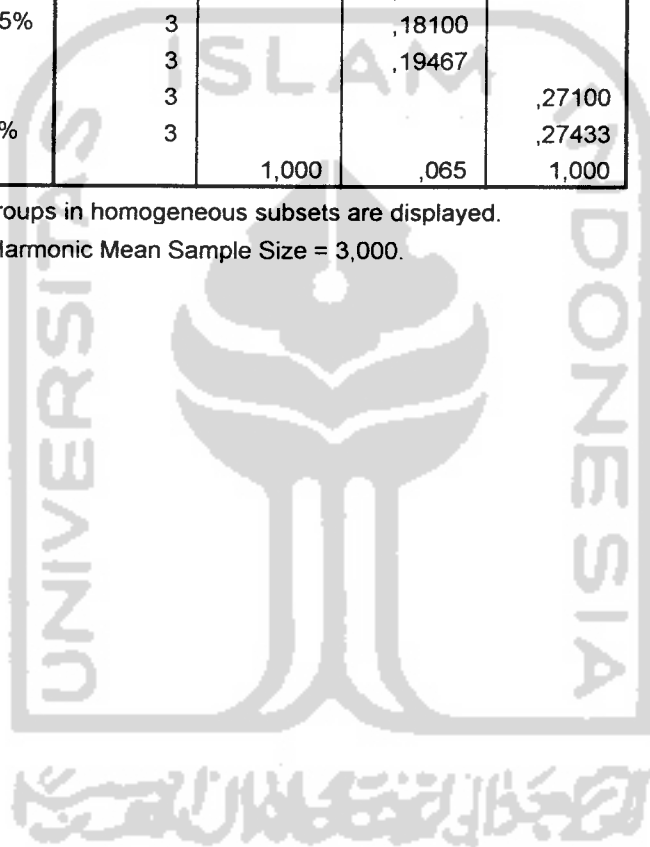
ABSORBAN

Tukey HSD^a

DOSIS	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tanpa sel	3	,05300		
kadar 5%	3		,13867	
kadar 2,5%	3		,14000	
kadar 1,25%	3		,17900	
kadar 0,3125%	3		,18100	
kontrol ngtf	3		,19467	
kontrol pstf	3			,27100
kadar 0,625%	3			,27433
Sig.		1,000	,065	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 14. surat bukti determinasi

BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI UGM

Alamat : Sekip Utara Jogjakarta
Telpon : 542738, 902568

SURAT KETERANGAN
Nomor : UGM/FA/112 /Ident/ V/2004

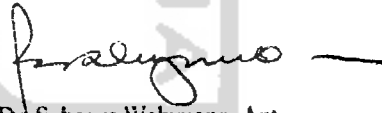
Yang bertanda tangan di bawah ini Kepala Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM menerangkan bahwa :

Nama : Ainur Ro'fah Hikmawati
No. Mhs. : 00613272

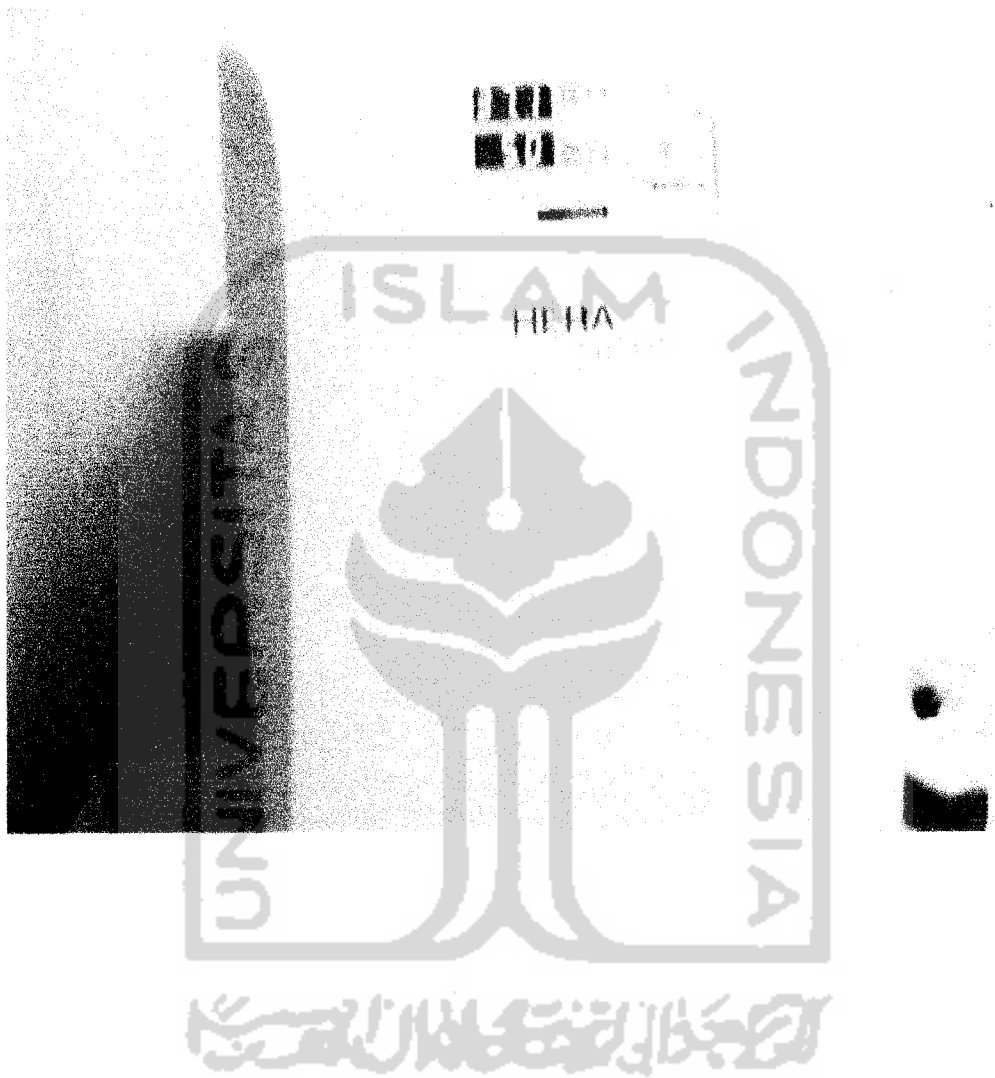
telah mengidentifikasi tanaman *Phaseolus aureus* Roxb. di Laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM.

Pada tanggal 12 Mei 2004.
Surat keterangan ini dapat digunakan seperlunya.

Jogjakarta, 13 Mei 2004
Bagian Biologi Farmasi
Kepala


Dr. Subagus Wahyuono, Apt
NIP. 130604698

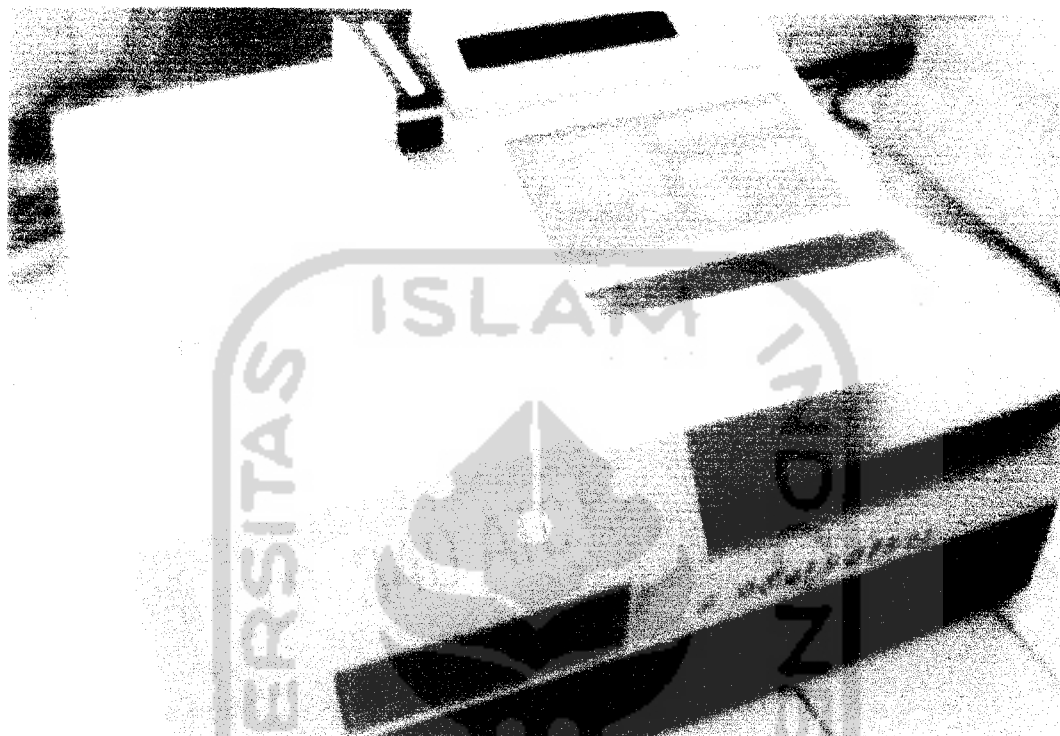
Lampiran 10. Foto inkubator CO₂



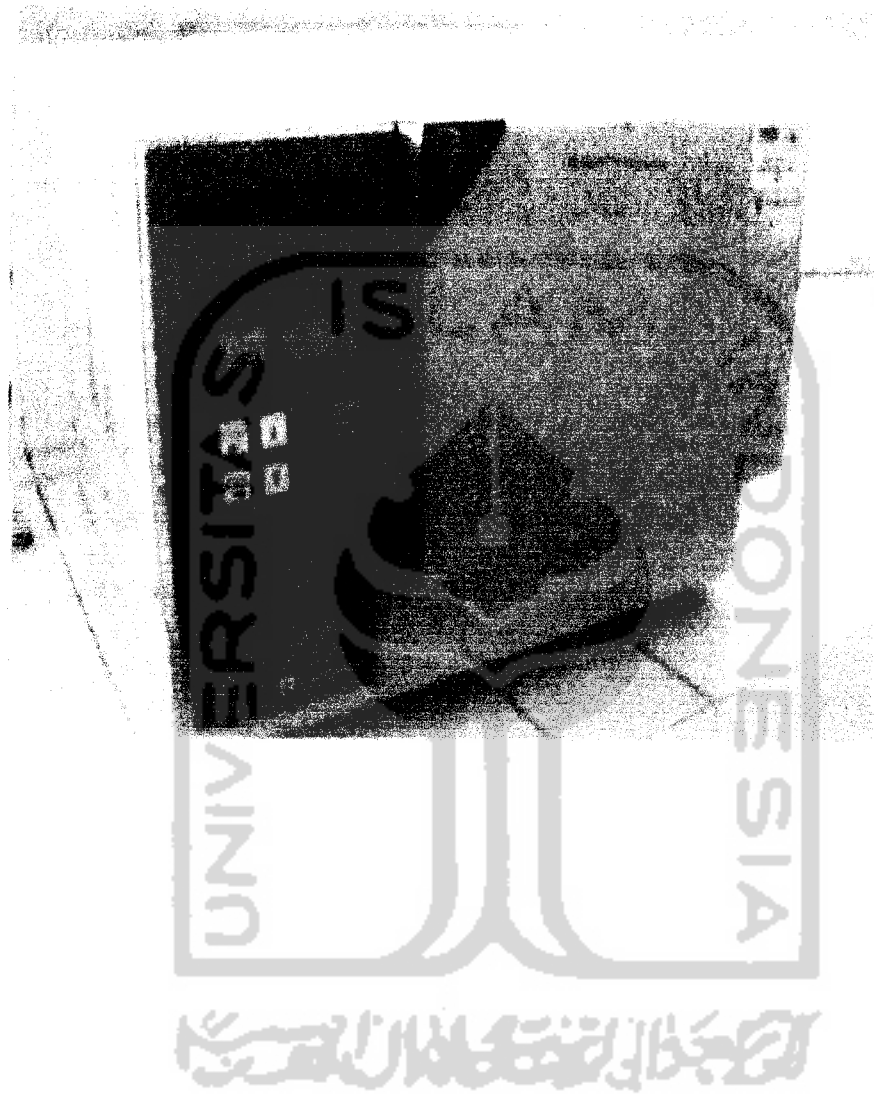
Lampiran 11. Foto *inverted mikroskop*



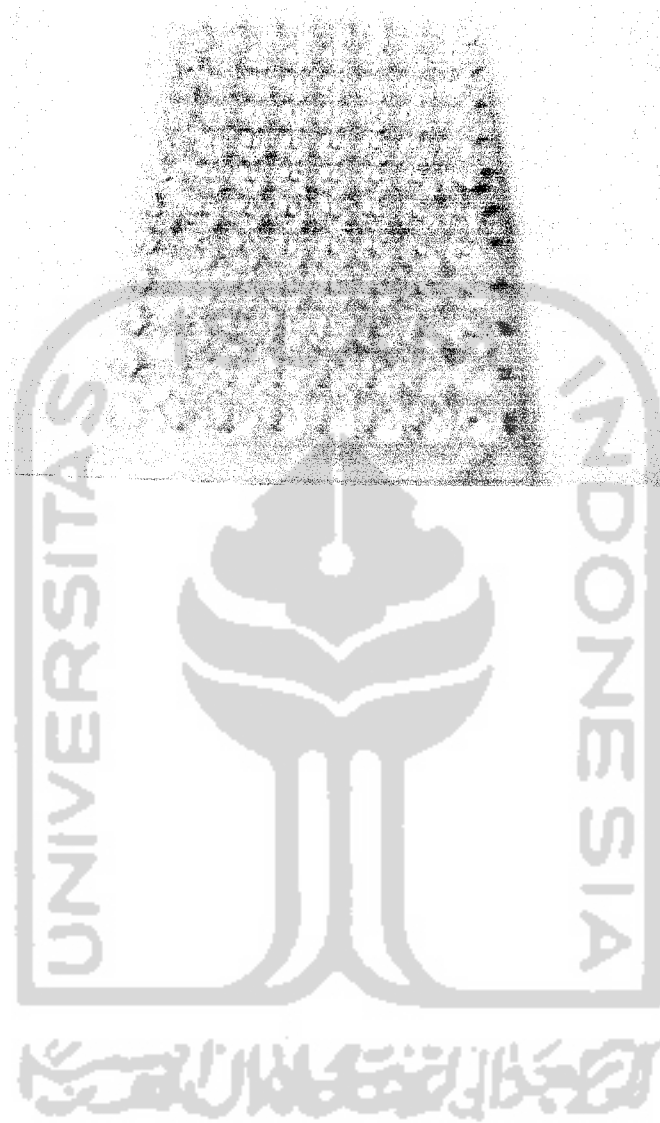
Lampiran 12. Foto ELISA reader



Lampiran 13. Foto inkubator suhu kamar



Lampiran 14. foto plate seteah diberi OPD



Lampiran 14. surat bukti determinasi

BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI UGM

Alamat : Sekip Utara Jogjakarta
Telpon : 542738, 902568

SURAT KETERANGAN

Nomor : UGM/FA/112/Ident/ V/2004

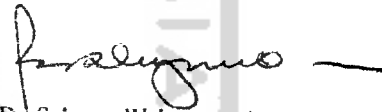
Yang bertanda tangan di bawah ini Kepala Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM menerangkan bahwa :

Nama : Ainur Ro'fah Hikmawati
No. Mhs. : 00613272

telah mengidentifikasi tanaman *Phaseolus aureus* Roxb. di Laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM.

Pada tanggal 12 Mei 2004.
Surat keterangan ini dapat digunakan seperlunya.

Jogjakarta, 13 Mei 2004
Bagian Biologi Farmasi
Kepala


Dr. Subagus Wahyuono, Apt
NIP. 130604698