

MIPA

**Laporan  
Hibah Penelitian Strategis Nasional  
Tahun Anggaran 2009**



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

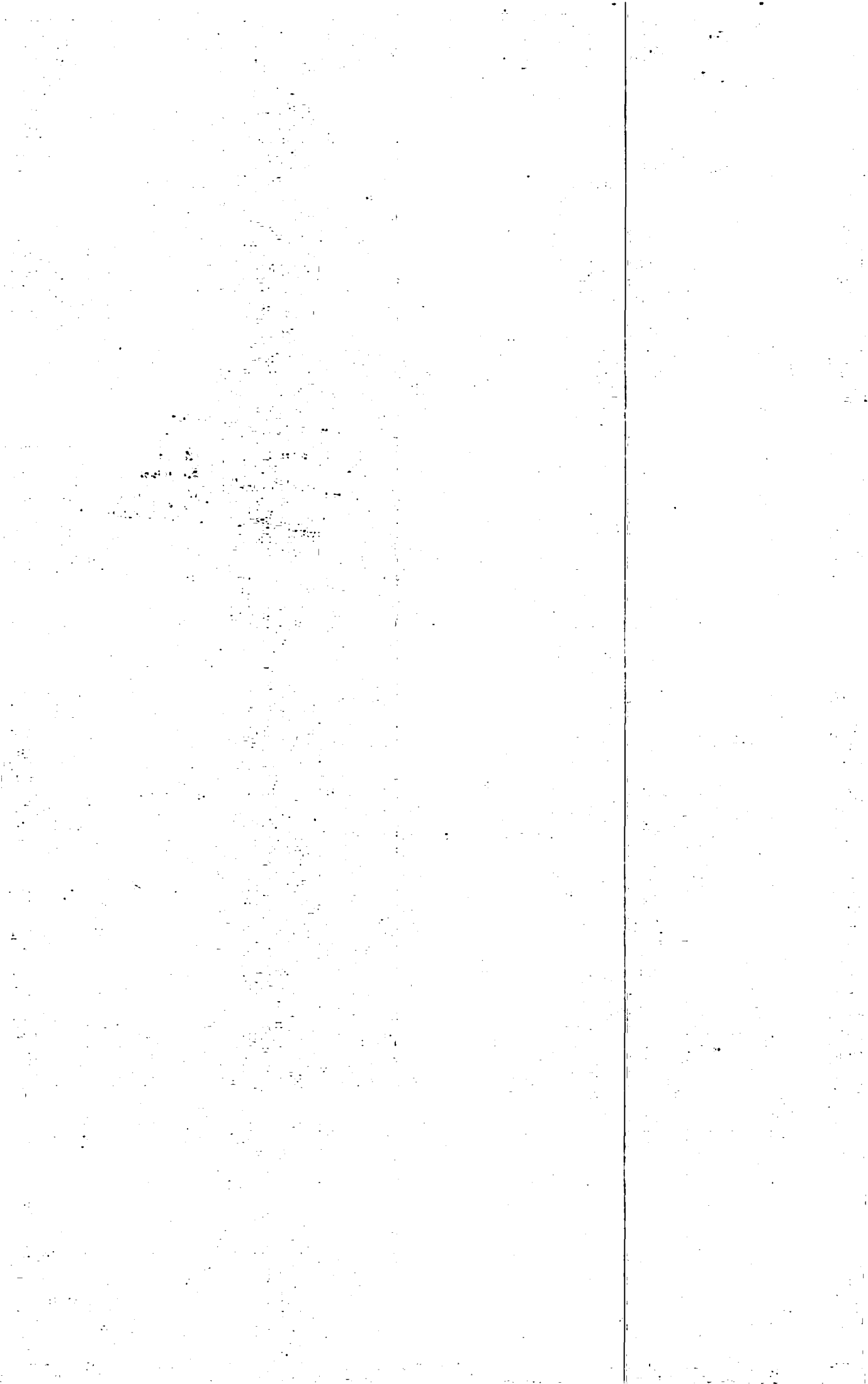
BIOAKTIVITAS POLISAKARIDA KRESTIN DARI EKSTRAK  
JAMUR *Cariolus versicolor* SEBAGAI IMUNOMODULATOR  
RESPON IMUN AKIBAT INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis*

Peneliti :

Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.  
Prof. Win Darmanto, MS. Ph.D.  
Dra. Nurul Wiqoyah, M.Si.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat  
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor: 276/H3/KR/ 2009 Tanggal 16 Februari 2009

Universitas Airlangga  
Oktober 2009



MIPA

**Laporan  
Hibah Penelitian Strategis Nasional  
Tahun Anggaran 2009**



lck  
lckc  
LP. 48/10  
Wah  
b

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

BIOAKTIVITAS POLISAKARIDA KRESTIN DARI EKSTRAK  
JAMUR *Cariolus versicolor* SEBAGAI IMUNOMODULATOR  
RESPON IMUN AKIBAT INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis*

Peneliti :

Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.  
Prof. Win Darmanto, MS. Ph.D.  
Dra. Nurul Wiqoyah, M.Si.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat  
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor: 276/H3/KR/ 2009 Tanggal 16 Februari 2009

Universitas Airlangga  
Oktober 2009

MIPA

Lampiran  
Lampiran Penelitian Strategis Nasional  
Tahun Anggaran 2009



MILITR  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

BIOAKTIVITAS POLISAKARIDA KRESTIN DARI EKSTRAK  
JAMUR *Cantharellus versicolor* SEBAGAI IMMUNOMODULATOR  
RESPON IMUN AKIBAT INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis*

Peneliti :

Dra. Sri Puji Astuti Widyadarmasari, M.Si  
Prof. Win Damaranto, M.Si, Ph.D.  
Dra. Nurul Widyah, M.Si

Dipaparkan oleh DIPA Universitas Airlangga dalam kegiatan tahun anggaran 2009, sesuai dengan surat  
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor 228/2009/KR/2009 Tanggal 16 Februari 2009

Universitas Airlangga  
Oktober 2009

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN

**1. Judul usulan :**

Bioaktivitas polisakarida krestin dari ekstrak jamur *Cariolus versicolor* sebagai imunomodulator respon imun akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

**2. Ketua peneliti :**

- a. Nama Lengkap : Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan (P)
- c. NIP : 131999645
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Jabatan Struktural : -
- f. Bidang Keahlian : Immunologi
- g. Fakultas/Departemen: Sains dan Teknologi/Biologi
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- i. Tim Peneliti

| NO | NAMA                          | BIDANG KEAHLIAN    | FAKULTAS/ DEPARTEMEN | PERGURUAN TINGGI      |
|----|-------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|
| 1. | Prof. Dr. Win Darmanta, M.Si. | Biologi Reproduksi | FST/Biologi          | Universitas Airlangga |
| 2. | Dra. Nurul Wiqoyah, M.Si.     | Mikrobiologi       | Kedokteran           | Universitas Airlangga |


**3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian**

- a. Jangka Waktu Penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp 100.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp 100.000.000,-

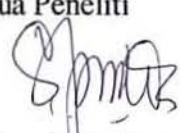
Surabaya, Oktober 2009

Mengetahui :

Dekan Fakultas FST UNAIR

  
Drs. Salamun, M.Kes.  
NIP. 131696506

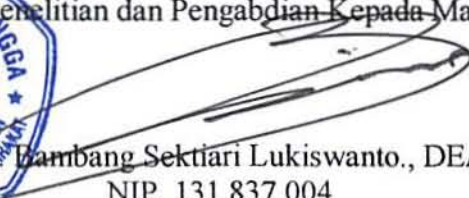
Ketua Peneliti

  
Dra. Sri Puji Astuti W., M.Si.  
NIP. 131999645

Menyetujui

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair,



  
Bambang Sektiari Lukiswanto., DEA.drh.  
NIP. 131 837 004



**BIOAKTIVITAS POLISAKARIDA KRESTIN DARI  
EKSTRAK JAMUR *Cariolus versicolor* SEBAGAI IMUNOMODULATOR  
RESPON IMUN AKIBAT INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis***

Sri Puji Astuti Wahyuningsih<sup>1</sup>, Win Darmanto<sup>1</sup>  
Nurul Wiqoyah<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Departemen Biologi, FST, Universitas Airlangga, Kampus C. Jl. Mulyorejo Surabaya

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Kampus A. Jl Moestopo Surabaya

**RINGKASAN**

*Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri TB yang menyerang paru. Pada umumnya, penderita TB mempunyai daya tahan tubuh yang rendah. Ekstrak dinding sel dari *Coriolus vesicolor* dapat menstimuli respon imun yang penting untuk menjaga kesehatan. Kandungan aktif dari *Coriolus vesicolor* adalah polisakarida. Polisakarida  $\beta$ -glucan terikat dengan protein krestin yang dikenal dengan nama *polysaccharide krestin* (PSK)

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh polisakarida krestin (PSK) yang diisolasi dari ekstrak jamur *Cariolus versicolor* isolat lokal dan mengetahui peranannya sebagai imunomodulator respon imun akibat infeksi *M. tuberculosis*. Hasil penelitian diharapkan dapat menggali potensi bahan hayati alami asli Indonesia yang berfungsi sebagai imunomodulator, yaitu memperbaiki dan memperkuat respon imun (*imunostimulasi*) atau mengembalikan fungsi respon imun yang terganggu (*imunorestorasi*).

Penelitian ini menggunakan jamur *Cariolus versicolor* yang hidup dibatang kayu mati. Senyawa PSK diisolasi dari jamur. Mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb/C, umur 8-10 minggu dibagi menjadi 6 kelompok: 1) kontrol, 2) infeksi bakteri TB saja, 3) pemberian PSK saja, 4) pemberian PSK sebelum infeksi TB, 5) pemberian PSK setelah infeksi TB, dan 6) pemberian PSK sebelum dan setelah infeksi TB. *M. tuberculosis* diberikan 2 kali secara intraperitoneal dengan selang waktu 1 minggu, dan 1 jam sebelum pengamatan, dosis 0,5 Mc. Farland. PSK diberikan setiap hari selama 1 minggu, konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Lima hari setelah perlakuan, mencit dibedah. Darah diambil dari jantung dan makrofag diambil dari cavum peritoneum. Parameter yang diamati adalah pengamatan terhadap kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten (jumlah total leukosit dan makrofag serta gambaran histologis derivat leukosit), pengamatan terhadap kondisi respon imun non-spesifik (uji fungsi fagositosis makrofag *in-vivo*) serta pengamatan terhadap kondisi respon imun spesifik (pembentukan antibodi, analisis isotipe imunoglobulin dan kadar IFN- $\gamma$  dengan ELISA).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan pada total leukosit, makrofag, limfosit, aktivitas dan kapasitas fagositosis, produksi antibodi, IFN- $\gamma$  dengan kelas IgG (subkelas IgG1, IgG2a, IgG2b, dan IgG3).

Kesimpulan penelitian adalah PSK mampu memperbaiki kondisi sel-sel imunokompeten, mampu mengembalikan dan memperkuat fungsi respon imun non-spesifik, serta dapat mengembalikan dan memperkuat respon imun spesifik akibat infeksi *M. tuberculosis*

**Kata kunci:** *Cariolus versicolor*, polisakarida krestin, *Mycobacterium tuberculosis*, imunomodulator, respon imun.

**BIOACTIVITY OF POLYSACCHARIDE KRESTIN FROM FUNGI  
EXTRACT OF *Coriolus versicolor* AS RESPONSE IMMUNE  
IMMUNOMODULATOR EXPOSED BY *Mycobacterium tuberculosis***

Sri Puji Astuti Wahyuningsih<sup>1</sup>, Win Darmanto<sup>1</sup>  
Nurul Wiqoyah<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Depart. of Biology, FST, Universitas Airlangga, Kampus C. Jl. Mulyorejo Surabaya

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Kampus A. Jl Moestopo Surabaya

**SUMMARY**

*Mycobacterium tuberculosis* is the TB bacteria that attacks the lungs. In general, people with TB have immune system is low. Cell wall extract from *Coriolus versicolor* can menstimuli immune response. Active ingredients of *C. versicolor* is polysaccharides. The krestin protein-bound  $\beta$ -glucan polysaccharide known as krestin polysaccharide (PSK).

This study aims to obtain a polysaccharide krestin (PSK) isolated from *C. versicolor* mushroom extract local isolates and knows his role as an immune response imunomodulator infection *M. tuberculosis*. The results are expected to explore the potential of indigenous natural biological materials that function as Indonesia imunomodulator, namely to improve and strengthen the immune response (immunostimulan) or restore the function of the disturbed immune response (immunorestitution).

This research used *C. versicolor* mushroom that living dead wood. PSK compounds isolated from mushrooms. Mice (*Mus musculus*) strain of female Balb / C, 8-10 weeks of age divided into 6 groups: 1) control, 2) provision of PSK, 3) TB bacterial infection alone, 4) provision of PSK prior TB infection, 5) provision of PSK after TB infection, and 6) provision of PSK before and after TB infection. *M. tuberculosis* was given by intraperitoneal 2 times with an interval of 1 week and 1 hour before the observation, the dose of 0.5 Mc. Farland. PSK was given every day for 1 week, the concentration of 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Five days after treatment, mice surgery. Blood was taken from the heart and macrophages derived from peritoneal cavum. The observed parameters is the observation of the condition of the spleen and immunocompetent cells (total number of leukocytes and macrophages and leukocytes derivatives histological picture), observations on the condition of the immune response of non-specific (or test phagocytosis function of macrophages in-vivo) and the observation of the condition of specific immune response (formation of antibodies, immunoglobulin isotype analysis and IFN- $\gamma$  levels by ELISA).

The results showed that an increase in total leukocytes, macrophages, lymphocytes, activity and capacity of phagocytosis, antibody production, IFN- $\gamma$  to the class IgG (subclass IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3).

PSK conclusions are capable of improving conditions immunocompetent cells, able to restore and strengthen the immune response function of non-specific, and can restore and strengthen the specific immune response due to infection of *M. tuberculosis*

**Keywords:** *Coriolus versicolor*, polysaccharide krestin, *Mycobacterium tuberculosis*, imunomodulator, immune response.





## **PRAKATA**

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT. atas berkat limpahan rahmat-Nya penelitian ini telah terlaksana walaupun belum sebagaimana penulis harapkan. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga.
2. Pimpinan Fakultas Sains dan Teknologi (FST), Universitas Airlangga.
3. Ketua Departemen Biologi, FST, Universitas Airlangga.
4. Ketua Departemen Kimia, FST, Universitas Airlangga.
5. Kepala Institut of Tropical Disease (ITD), Universitas Airlangga
6. Staf Laboratorium Biokimia, FST, Universitas Airlangga.
7. A. Aris Hairubbi AS (08061006), Amalia Nur Masitha (080610210), Risa Purnamasari (080610259), Adita Ayu P. (080610257), dan Risky B.A. mahasiswa angkatan 2006, Program Studi Biologi, FST, Universitas Airlangga yang telah berperan serta dalam penelitian ini.
8. Rekan-rekan yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini yang belum penulis sebutkan satu persatu.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan dari tulisan ini. Akhirnya, semoga karya penelitian ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Oktober 2009

Penulis

# DAFTAR ISI

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

|   | Halaman |
|---|---------|
| HALAMAN PENGESAHAN .....  | ii      |
| RINGKASAN .....   | iii     |
| SUMMARY .....   | iv      |
| PRAKATA .....   | v       |
| DAFTAR ISI .....  | vi      |
| DAFTAR TABEL .....  | viii    |
| DAFTAR GAMBAR .....   | ix      |
| DAFTAR LAMPIRAN .....   | x       |
| BAB I PENDAHULUAN .....   | 1       |
| 1.1. Latar Belakang Permasalahan .....  | 1       |
| 1.2. Rumusan Masalah .....  | 5       |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....   | 6       |
| 2.1. Deskripsi <i>Coriolus versicolor</i> .....                                 | 6       |
| 2.2. Polisakarida Krestin (PSK) .....   | 7       |
| 2.3. Imunomodulator Polisakarida Krestin (PSK) .....                            | 10      |
| 2.4. <i>M. tuberculosis</i> , Patogenesis, dan Patofisiologi Tuberculosis ..... | 12      |
| 2.5. Mekanisme Proteksi Imun terhadap TB .....                                  | 15      |
| 2.6. Fase Pembentukan Respons Imun .....  | 18      |
| BAB III HIPOTESIS, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....                          | 21      |
| 3.1. Hipotesis Penelitian .....   | 21      |
| 3.2. Tujuan Penelitian .....  | 21      |
| 3.3. Manfaat Penelitian .....   | 22      |
| BAB IV METODE PENELITIAN .....  | 23      |
| 4.1. Bahan Penelitian .....   | 24      |
| 4.2. Alat Penelitian .....  | 24      |
| 4.3. Prosedur Penelitian .....  | 25      |
| 4.3.1. Koleksi dan pembuatan serbuk jamur <i>C. versicolor</i> .....            | 25      |
| 4.3.2. Pembuatan ekstrak jamur <i>Cariolus versicolor</i> .....                 | 25      |
| 4.3.3. Pembuatan polisakaropeptida kasar dan isolasi PSK .....                  | 25      |
| 4.3.4. Isolasi dan perbanyakkan <i>M. Tuberculosis</i> .....                    | 26      |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.5. Pemberian PSK dan infeksi <i>M. tuberculosis</i> .....   | 26        |
| 4.3.6. Pengamatan kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten ..... | 28        |
| 4.3.7. Pengamatan kondisi respon imun non-spesifik .....        | 30        |
| 4.3.8. Pengamatan kondisi respon imun spesifik .....            | 31        |
| 4.4. Variabel Penelitian .....                                  | 33        |
| 4.5. Rancangan Penelitian .....                                 | 33        |
| 4.6. Analisis Data .....  | 33        |
| <b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>                         | <b>35</b> |
| 5.1. Pengamatan kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten .....   | 35        |
| 5.1.1. Berat limpa .....  | 35        |
| 5.1.2. Jumlah total leukosit .....                              | 36        |
| 5.1.3 Jumlah total makrofag .....                               | 37        |
| 5.1.4. Gambaran histologis derivat-derivat leukosit .....       | 39        |
| 5.2. Pengamatan kondisi respon imun non-spesifik .....          | 44        |
| 5.3. Pengamatan kondisi respon imun non spesifik .....          | 48        |
| 5.3.1. Pembentukan antibodi .....                               | 48        |
| 5.3.2 Macam imunoglobulin .....                                 | 49        |
| 5.3.3. IFN-gamma .....  | 51        |
| <b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>                        | <b>53</b> |
| 6.1. Kesimpulan .....   | 53        |
| 6.2. Saran .....  | 53        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>                                     | <b>54</b> |

## DAFTAR TABEL

| Tabel | Judul   | Halaman |
|-------|---|---------|
| 4.1.  | Pembagian kelompok dalam penelitian .....               | 27      |
| 5.1.  | Rerata berat limpa mencit pada berbagai perlakuan ..... | 35      |
| 5.2.  | Rerata jumlah total leukosit .....                      | 36      |
| 5.3.  | Rerata jumlah total makrofag .....                      | 38      |
| 5.4.  | Rerata persentase limfosit .....                        | 40      |
| 5.5.  | Rerata persentase monosit .....                         | 41      |
| 5.6.  | Rerata persentase eosinofil .....                       | 42      |
| 5.7.  | Rerata persentase basofil .....                         | 43      |
| 5.8.  | Rerata persentase neutrofil .....                       | 44      |
| 5.9.  | Rerata aktivitas fagositosis sel makrofag .....         | 46      |
| 5.10. | Rerata kapasitas fagositosis sel makrofag .....         | 47      |
| 5.11. | Antibodi yang ditunjukkan dengan nilai OD .....         | 49      |
| 5.12. | Macam imunoglobulin (Ig) n.....                         | 49      |
| 5.13. | Nilai OD dari pengukuran IFN- $\gamma$ .....            | 52      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Judul  | Halaman |
|--------|--|---------|
| 2.1    | Morfologi <i>Coriolus versicolor</i> .....   | 7       |
| 2.2    | Struktur molekul primer polisakarida yang disekresi oleh <i>C. versicolor</i> .... | 9       |
| 2.3    | Interaksi makrofag dan limfosit pada pasien tuberkulosis .....                     | 17      |
| 4.1    | Bagan alir penelitian .....  | 23      |
| 4.2    | <i>Haemocytometer Improve Neubauer</i> .....                                       | 29      |
| 5.1.   | Sel makrofag dalam haemositometer .....  | 38      |
| 5.2.   | Makrofag sedang melakukan aktivitas fagositosis .....                              | 45      |
| 5.3.   | Hasil ELISA dalam pengukuran antibodi .....  | 49      |

## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Judul   | Halaman |
|----------|---|---------|
| 1.       | Penentuan kadar karbohidrat dan kurva baku .....                | 57      |
| 2.       | Optimasi konsentrasi amonium sulfat .....                       | 59      |
| 3.       | Analisis data berat limpa .....                                 | 60      |
| 4.       | Analisis data jumlah total leukosit .....                       | 61      |
| 4.       | Analisis data jumlah total makrofag .....                       | 63      |
| 5.       | Analisi data gambaran histologis derivat-derivat leukosit ..... | 65      |
| 6.       | Analisis data uji fagositosis makrofag .....                    | 74      |
| 7.       | Analisis data nilai OD antibodi .....                           | 77      |
| 8.       | Analisis data nilai IFN- $\gamma$ .....                         | 79      |



## BAB I PENDAHULUAN



### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

*Mycobacterium tuberculosis* (TB) telah menginfeksi sepertiga penduduk dunia. Menurut WHO sekitar 8 juta penduduk dunia diserang TB dengan kematian 3 juta orang per tahun (WHO, 1993). Penderita TB yang berada di negara-negara berkembang diperkirakan 95%. Jumlah penderita TB akan meningkat dengan munculnya epidemi HIV/AIDS di dunia. Kematian wanita karena TB lebih banyak daripada kematian karena kehamilan, persalinan serta nifas (WHO, 1993). WHO mencanangkan keadaan darurat global untuk penyakit TB pada tahun 1993 karena diperkirakan sepertiga penduduk dunia telah terinfeksi kuman TB.

Hasil Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1995 di Indonesia menunjukkan bahwa tuberkulosis merupakan penyebab kematian nomor 3 setelah penyakit kardiovaskuler dan penyakit saluran pernapasan pada semua golongan usia dan nomor satu dari golongan infeksi. Antara tahun 1979 - 1982 telah dilakukan survey prevalensi di 15 propinsi dengan hasil ada 200-400 penderita setiap 100.000 penduduk.

Kuman TB menyerang pada sebagian besar kelompok usia kerja produktif, kebanyakan dari kelompok sosio ekonomi rendah. Pada tahun 1995-1998, cakupan penderita TB paru dengan strategi *Directly Observed Treatment Shortcourse Chemotherapy* (DOTS) atau pengawasan langsung (menelan obat jangka pendek setiap hari) telah mencapai 36% dengan angka kesembuhan 87%. Sebelum strategi DOTS (1969-1994), cakupannya sebesar 56% dengan angka kesembuhan yang hanya mencapai 40-60%. Pengobatan yang tidak teratur dan kombinasi obat yang tidak cukup

menimbulkan kekebalan kuman TB terhadap obat anti tuberkulosis secara meluas atau *multi drug resistance*.

Sebagian besar kuman TB menyerang paru, tetapi dapat juga mengenai organ tubuh lainnya. Sumber penularannya adalah penderita TB basil tahan asam (BTA) positif. Pada waktu batuk atau bersin, penderita menyebarkan kuman ke udara dalam bentuk droplet (percikan dahak). Droplet yang mengandung kuman dapat bertahan di udara pada suhu kamar selama beberapa jam. Orang dapat terinfeksi jika droplet terhirup ke saluran pernapasan. Selama kuman TB masuk dalam tubuh manusia melalui pernapasan, kuman TB tersebut dapat menyebar dari paru ke bagian tubuh lainnya melalui sistem peredaran darah, sistem saluran limfe, saluran napas, atau penyebaran langsung ke bagian-bagian tubuh lainnya.

Resiko penularan setiap tahun (*Annual Risk of Tuberculosis Infection = ARTI*) di Indonesia dianggap cukup tinggi dan bervariasi antara 1 - 2 %. Pada daerah dengan ARTI sebesar 1 %, berarti setiap tahun 10 (sepuluh) orang akan terinfeksi diantara 1000 penduduk. Sebagian besar orang yang terinfeksi tidak akan menjadi penderita TB, tetapi hanya 10 % yang akan menjadi penderita TB. Dari keterangan tersebut diatas, dapat diperkirakan bahwa daerah dengan ARTI 1 %, maka diantara 100.000 penduduk rata-rata terjadi 100 (seratus) penderita tuberkulosis setiap tahun, dimana 50 % penderita adalah BTA positif. Faktor yang mempengaruhi kemungkinan seseorang menjadi penderita TB adalah daya tahan tubuh yang rendah, diantaranya karena gizi buruk atau HIV/AIDS.

Penelitian ini dilakukan untuk mencari suatu bahan alam yang melimpah di alam Indonesia untuk digunakan sebagai imunomodulator respon imun yang bermanfaat mencegah terinfeksi *M. tuberculosis*. Menurut Anonimus (2004), ekstrak dinding sel dari

jamur *Coriolus versicolor* secara klinik dapat menstimuli dan meningkatkan pertahanan alami tubuh dan penting untuk menjaga kesehatan. Berdasarkan penelitian peneliti menunjukkan bahwa 1) ekstrak *C. versicolor* yang diberikan sebelum induksi 2-ME mampu memperkuat respon imun (imunostimulasi) dengan meningkatkan jumlah total leukosit dan jumlah makrofag, 2) ekstrak jamur *C. versicolor* yang diberikan sesudah induksi 2-ME mampu mengembalikan fungsi respon imun (imunorestorasi) dengan meningkatkan jumlah total leukosit, jumlah makrofag, dan berat limfa, 3) ekstrak jamur *C. versicolor* yang diberikan sebelum dan setelah induksi 2-ME dapat memperkuat dan mengembalikan fungsi respon imun non-spesifik terutama terjadi peningkatan jumlah total leukosit dan jumlah makrofag, dan 4) pemberian ekstrak jamur sesudah induksi 2-ME relatif lebih menguntungkan sebagai imunorestorasi respon imun non-spesifik (Wahyuningsih, 2006). Walaupun ekstrak jamur tersebut telah digunakan secara klinik untuk terapi penderita tumor dan kanker, tetapi kegunaannya dalam memperbaiki respon imun akibat infeksi *M. tuberculosis* belum pernah dikaji.

Kandungan aktif yang utama dalam *C. versicolor* adalah polisakarida. Polisakarida disusun dalam kombinasi unik antara protein dan  $\beta$ -glucan yang tidak terpengaruh oleh proses pencernaan dan efektif digunakan melalui oral. Kombinasi antara protein krestin dan polisakarida  $\beta$ -glucan lebih dikenal dengan nama *polysaccharide krestin* (PSK) (Anonimus, 2004).

Menurut Pedrinaci *et al.* (1999), PSK mempunyai potensi sebagai *biological response modifier* atau agen pengubah respon biologis yang penting dalam mempertahankan kelangsungan hidup dan menginduksi sitotoksitas sel NK. Menurut Pang (2003), PSK dapat menginduksi sekresi dan ekspresi gen *macrophages-colonies*

*stimulating factor* (M-CSF) pada makrofag dalam cavum peritoneum mencit melalui induksi transkripsi.

Menurut Cui and Chisti (2003), PSK mempunyai efek sebagai peningkat respon imun (*enhanced immune function*) dengan menginduksi produksi interleukin-6, interferon, IgG, makrofag, dan limfosit T. Polisakarida krestin juga menekan efek kemoterapi dan radioterapi, serta menghambat proliferasi berbagai sel kanker dengan memproduksi *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathionine peroxidase*. Menurut Jin (1999) dan Ze *et al.* (2003) dalam Cheng and Leung (2008) menyatakan bahwa nilai LD<sub>50</sub> PSK pada mencit adalah 26,00-300,36 mg/kg yang administrasi secara injeksi intraperitoneal. Dosis toleran pada mencit adalah 18-20 g/kg

Pada penelitian ini menggunakan mencit betina strain Balb/C, untuk mencari mekanisme penurunan respon imun akibat infeksi *M. tuberculosis*. Sedangkan, pemberian polisakarida krestin (PSK) dari ekstrak jamur *C. versicolor* pada mencit sebelum dan atau sesudah infeksi *M. tuberculosis* diharapkan berfungsi sebagai imunomodulator, yaitu mengembalikan fungsi respon imun yang terganggu (*imunorestorasi*) dan atau memperkuat respon imun (*imunostimulasi*). PSK diharapkan mampu memulihkan penurunan respon imun akibat infeksi *M. tuberculosis* berupa perbaikan kondisi sel-sel imunokompeten, peningkatan kondisi respon imun non-spesifik dan respon imun spesifik.

## 1.2. Rumusan Masalah

Masalah yang ingin dijawab dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah PSK mampu memperbaiki kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten melalui meningkatkan jumlah total leukosit, jumlah makrofag dan gambaran histologis derivat-derivat leukosit pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis* ?
2. Apakah PSK mampu mengembalikan dan atau memperkuat fungsi respon imun non-spesifik melalui uji fungsi fagositosis sel-sel makrofag secara *in vivo* pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*?
3. Apakah PSK dapat mengembalikan dan atau memperkuat respon imun spesifik melalui pengukuran pengukuran kadar IFN- $\gamma$ , titer antibodi dan analisis isotipe imunoglobulin dengan teknik ELISA pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*?

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Deskripsi *Coriolus versicolor*

Klasifikasi dari jamur *Coriolus versicolor* menurut Arjun dan Ramesh (1982)

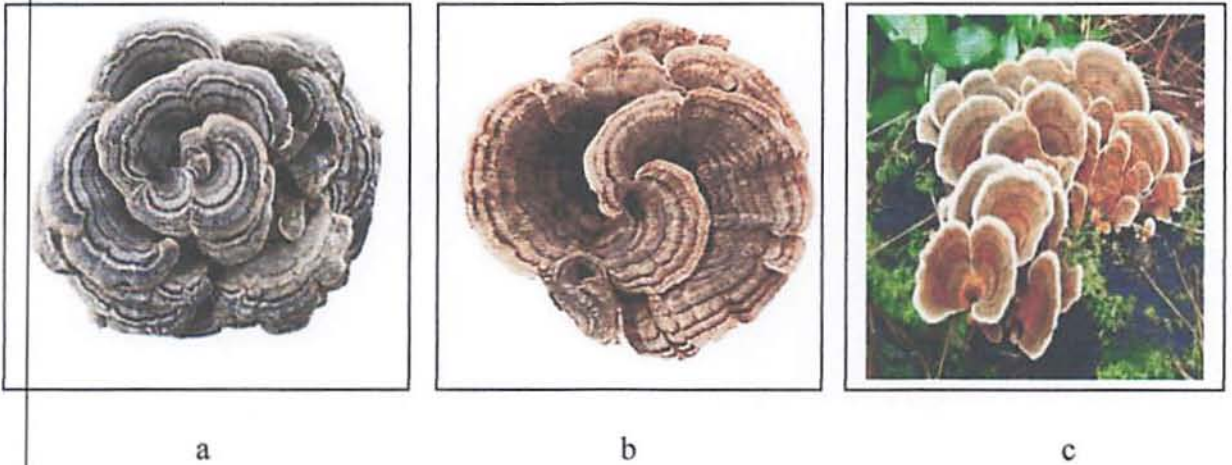
adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi  
Phyllum : Basidiomycota  
Clasis : Basidiomycetes  
Subclassis : Homobasidiomycetes  
Ordo : Polyporales  
Familia : Polyporaceae  
Genus : *Coriolus*  
Species : *Coriolus versicolor* L.

*Coriolus versicolor* adalah jamur yang bersifat aerob obligat dan tumbuh secara sejajar atau tumpang tindih pada berbagai substrat seperti gergajian kayu, kayu mati, batang dan ranting pohon. Jamur tersebut tumbuh pada daerah beriklim sedang seperti Asia, Amerika Utara, dan Eropa (Anonimus, 2004). Bentuk tubuh buah *Coriolus versicolor* adalah semisirkuler atau seperti kipas dengan tepi bergelombang. permukaan atas berbeludru dengan zona konsentris yang multiwarna, yaitu coklat, kehikauan, atau hitam. Permukaan bawahnya berpori-pori kecil, berwarna putih hingga kuning muda. Panjang tubuh buah mencapai 10 cm, lebar 2-3 cm. Spora berbentuk kurva hingga silindris (4 - 6 x 1,5 - 2,5  $\mu\text{m}$ ) dengan warna hialin putih hingga pucat (Cui and Chisti, 2003).



*Coriolus versicolor* tumbuh secara sejajar atau tumpang tindih pada berbagai macam substrat, yaitu gergajian, kayu mati, batang dan ranting pohon. Jamur ini tumbuh pada daerah yang beriklim sedang di Asia, Eropa dan Amerika utara. Jamur ini memiliki banyak nama lain, diantaranya: *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Agaricus versicolor*, *Poria versicolor*, *Trametes versicolor*, *Polyticus versicolor*, *Yun-Zhi* (Cina), *Kawaratake* (Jepang) dan jamur *turkey tail* (di Amerika Utara) (Cui dan Chisti, 2003).



Gambar 2.1 Morfologi *Coriolus versicolor*. (a) berwarna abu-abu. (b) berwarna kuning, dan (c) *C. versicolor* tumbuh di atas bongkahan kayu (Anonimus, 2004).

Tubuh buah dari jamur ini tersusun oleh miselium (Asai *et al.*, 2000). Miselium terdiri dari sel yang memiliki dinding sel dan mengandung kitin. Kitin mengandung bahan aktif yaitu polisakarida (Yang *et al.*, 1993).

## 2.2 Polisakarida Krestin (PSK)

PSK merupakan bahan aktif yang diperoleh oleh ekstraksi jamur *Coriolus versicolor* (Pang *et al.*, 2003). Polisakarida krestin berupa serbuk berwarna coklat gelap atau terang yang larut dan stabil dalam air panas, tetapi tidak larut dalam *methanol*,

1. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)  
 2. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)  
 3. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)  
 4. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)  
 5. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)  
 6. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)



1. Gambar 2.1. *Chrysothrix curvata* (a) dan *Chrysothrix curvata* (b) dan *Chrysothrix curvata* (c) (Anonim, 2004)

1. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)  
 2. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)  
 3. *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. dan *Chrysothrix curvata* (L.) Berk. (1933)

2. *Polysporia kraskei* (ZS) Berk.

1. *Polysporia kraskei* (ZS) Berk. dan *Polysporia kraskei* (ZS) Berk. (1933)  
 2. *Polysporia kraskei* (ZS) Berk. dan *Polysporia kraskei* (ZS) Berk. (1933)  
 3. *Polysporia kraskei* (ZS) Berk. dan *Polysporia kraskei* (ZS) Berk. (1933)

*pyridine, chloroform, benzene, dan hexane* (Tsukagoshi *et al.*, 1984). Tersusun dari polisakaridapeptid (Cui and Chisti, 2003).

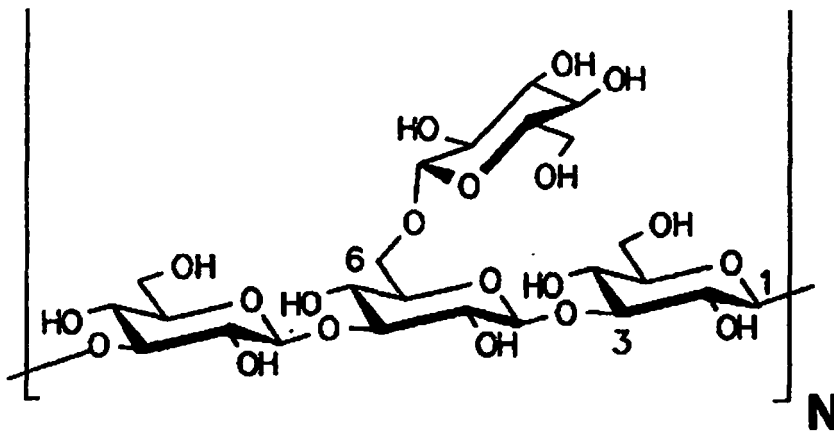
Analisis elemen polisakaridapeptid PSK tersusun dari oksigen 47,5%, karbon 40,5%, hidrogen 6,2%, dan nitrogen 5,2%, Ekstrak bubuk mengandung 34 – 35% karbohidrat terlarut (91 – 93%  $\beta$ -glucan), 28 – 35% protein, 7% kelembaban, 6 – 7% abu, dan sisanya adalah gula bebas dan asam amino (Cui and Chisti, 2003).

PSK adalah campuran polisakarida yang terikat secara kovalen pada sejumlah protein. Polisakarida dan peptida dari PSK tidak dapat dipisahkan dengan metode *native PAGE* dan kromatografi. Kedua produk mempunyai masa molekul sekitar 100 kDa dan polipeptidanya mengandung sejumlah besar asam aspartat dan asam glutamat. Asam amino asam dan netral seperti asam aspartat, treonin, serin, asam glutamat, glisin, alanin, valin, dan leusin sekitar 70% dari 18 macam asam amino yang ada. Polisakaridapeptid *C. versicolor* resisten terhadap enzim proteolisis (Cui and Chisti, 2003).

Senyawa PSK dalam ekstrak jamur *C. versicolor* mempunyai komponen utama glukukan dengan ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\beta$ -1,3 glukosidik. Karbohidrat penyusun utamanya adalah D-glukosa. PSK mengandung fukosa, juga ada *galactose, mannose* dan *xylose*. Setengah polisakarida adalah sangat bercabang (Cui and Chisti, 2003). Struktur primer polisakarida dari jamur *C. versicolor* dapat di lihat pada Gambar 2.2.

Adanya struktur  $\beta$  1-3-D glukukan ini berpengaruh terhadap stimulasi sistem imun nonspesifik dengan cara menunda terjadinya apoptosis dan membantu meningkatkan proliferasi sel makrofag (Taylor, 2002). Disamping itu pula  $\beta$ - glukukan juga mampu menstimulasi makrofag dengan peningkatan jumlah, ukuran dan fungsinya, menstimulasi sekresi lisozim dan TNF oleh makrofag teraktifkan, peningkatan fagositosis dari antigen,

aktivasi dari granulosit dan monosit, serta meningkatkan aktivitas limfosit B dan T (Meira, 1996). Adanya struktur tersebut memungkinkan untuk berikatan dengan makrofag, karena menurut penelitian yang dilakukan di universitas Harvard, pada permukaan membran sel makrofag setidaknya ada 7 reseptor spesifik untuk  $\beta$  glukukan (Fisher dan Yang, 2002) antara lain CR 3 (CD11b, CD18), *lactocylseramide*, *scavenger receptor*, dan *dectin-1* (Taylor, 2002). Menurut Taylor (2002), *Dectin-1* merupakan reseptor glukukan mayor pada leukosit dan berperan dalam pengenalan terhadap partikel  $\beta$  glukukan. Reseptor glukukan diekspresikan paling tinggi pada permukaan sel-sel myeloid (monosit atau makrofag, dan neutrofil). Menurut Anonimus (2004), reseptor  $\beta$ -glukan ditemukan pada sejumlah sel imun yang berbeda, meliputi sel NK dan neutrofil, monosit/makrofag, limfosit B dan T.



Gambar 2.2 Struktur molekul primer polisakarida yang disekresi oleh *C. versicolor* dalam spektra NMR (Rau *et al*, 2009).

### 2.3 Imunomodulator Polisakarida Krestin (PSK)

Imunodulasi yaitu tindakan dengan cara memberikan bahan-bahan yang dapat mengembalikan fungsi respon imun yang terganggu dari berbagai komponen sistem imun (*imunorestorasi*), memperbaiki dan memperkuat respon imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem imun (*imunostimulan*) atau menekan respon imun yang fungsinya berlebihan (*imunopresi*) (Baratawidjaja, 1996).

Respon imun terdiri dari respon imun alamiah (non-spesifik) dan respon imun adaptif (spesifik). Respon imun non-spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan terhadap antigen. Respon ini meliputi respon imun seluler yang berupa aktivitas fagositosis oleh sel-sel inflamasi dan respon imun humoral yang berasal dari komplemen yang berperan meningkatkan fagositosis melalui opsonisasi dan pelepasan faktor kemotaktik. Respon imun spesifik merupakan pertahanan tubuh kedua. Respon ini meliputi respon imun seluler yang melibatkan limfosit T dan respon imun humoral yang melibatkan pembentukan antibodi oleh limfosit B (Roitt *et al.*, 1993; Abbas *et al.*, 2000).

Senyawa PSK dalam ekstrak jamur *Coriolus versicolor* mempunyai efek fisiologis. Efek fisiologisnya adalah peningkatan respon imun dengan menginduksi produksi interleukin-6, interferon, Ig G, makrofag, dan limfosit T, menekan efek dari kemoterapi dan radioterapi, menghambat proliferasi berbagai sel kanker dengan memproduksi *superoxide dismutase* (SOD) dan *gluthationine peroxidase* (Cui and Chisti, 2003). Menurut Tzianabos (2000), PSK dalam ekstrak jamur *Coriolus versicolor* berpotensi sebagai imunostimulator dengan aktivitas spesifik untuk sel T dan *antigen-presenting cells* (APC) seperti monosit dan makrofag. Aktivitas spesifik dicirikan oleh kemampuannya meningkatkan jumlah sel darah putih, peningkatan produksi IFN- $\gamma$  dan

IL-2, dan peningkatan *delayed type hypersensitivity reactions*. Sejumlah laporan menyatakan bahwa PSK mampu mengaktifkan komponen seluler dan humoral dari sistem imun.

Ekstraks miselia *C. versicolor* yang dikenal pertama kali sebagai bahan terapi kanker, khususnya untuk pemulihan jaringan setelah operasi atau pengobatan kanker (Kondo *et al.*, 1981 dan Tsukagoshi *et al.*, 1984 dalam Kagohashi *et al.*, 2002). Menurut Di Renzo *et al.* (1991), ekstrak jamur *C. versicolor* mengandung polisakarida krestin yang dapat menstimulasi respon imun, menstimulasi fungsi *antigen-presenting cells* (APC) makrofag dan menstimulasi fungsi imun lainnya. Gotoh *et al.* (1991) melaporkan bahwa polisakarida tersebut dapat meningkatkan proliferasi limfosit B secara in-vitro. Menurut Tsukagoshi *et al.* (1984) dapat meningkatkan aktivitas sitotoksit sel NK.

Ekstrak jamur *Coriolus versicolor* sering digunakan untuk terapi yang dipadukan dengan terapi menggunakan radiasi. Perpaduan PSK dan radiasi akan mempercepat kesembuhan penderita kanker karena PSK mampu meningkatkan produksi sel imun (Kidd, 2000). Waktu paruh PSK dalam tubuh manusia sekitar 18 jam dan mampu menunjukkan adanya aktivasi makrofag, sel NK dan menstimulasi jumlah limfosit (Steinberg, 1997).

Menurut Pedrinaci *et al.* (1999), kandungan PSK dalam ekstrak jamur *Coriolus versicolor* juga berperan sebagai agen pengubah respon biologi (*biological response modifier*) yang penting dalam mempertahankan kelangsungan hidup sel NK (*natural killer cells*) dan menginduksi sitotoksisitas NK. Menurut Pang (2003), PSK dari ekstrak jamur *Coriolus versicolor* dapat menginduksi sekresi dan ekspresi gen *macrophages-*



*colonies stimulating factor* (M-CSF) pada makrofag peritoneal pada mencit, diduga melalui induksi transkripsi dari gen M-CSF pada sel makrofag.

#### **2.4 *Mycobacterium tuberculosis*, Patogenesis, dan Patofisiologi Tuberculosis**

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri yang termasuk dalam genus *Mycobacteria* dan tergolong Gram positif, non-motil, aerob, tersusun tunggal atau dalam kelompok 3-4 basil yang saling membentuk sudut. Anonimus (2000) menyatakan bahwa protein yang berasosiasi pada dinding sel berpotensi penting dalam pertahanan dan timbulnya imunopatologi selama infeksi.

Tempat masuk kuman *M. tuberculosis* adalah saluran pernapasan, saluran pencernaan, dan luka terbuka pada kulit. Kebanyakan infeksi TB terjadi melalui udara, yaitu melalui inhalasi droplet yang mengandung kuman-kuman basil tuberkel yang berasal dari orang terinfeksi (Subagyo dkk., 2006).

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit yang dikendalikan oleh respon imunitas diperantarai sel. Sel efektor adalah makrofag, dan limfosit (sel T) adalah sel imunoresponsif. Tipe imunitas seperti ini biasanya lokal, melibatkan makrofag yang diaktifkan di tempat infeksi oleh limfosit dan limfokinnya. Respon ini disebut reaksi hipersensitivitas selular (Subagyo dkk., 2006).

Basil tuberkel yang mencapai permukaan alveolus biasanya diinhalasi sebagai suatu unit yang terdiri dari satu sampai tiga basil, gumpalan yang lebih besar cenderung tertahan di saluran hidung dan cabang besar bronkus dan tidak menyebabkan penyakit. Setelah berada dalam ruang alveolus, biasanya di bagian bawah lobus atas paru atau di bagian atas lobus bawah, basil tuberkel ini membangkitkan reaksi inflamasi. Leukosit polimorfonuklear tampak pada tempat tersebut dan memfagosit bakteri walau tidak

membunuhnya. Sesudah hari-hari pertama, leukosit diganti oleh makrofag. Alveoli yang terserang akan menalami konsolidaasi, dan timbul pneumonia akut. Pneumonia selular ini dapat sembuh dengan sendirinya, sehingga tidak ada sisa yang tertinggal, atau proses dapat berjalan terus dan bakteri terus difagosit atau berkembangbiak di dalam sel. Basil juga menyebar melalui getah bening menuju ke kelenjar getah bening regional. Makrofag yang mengadakan infiltrasi menjadi lebih panjang dan sebagian bersatu sehingga membentuk sel tuberkel epiteloid yang dikelilingi limfosit. Reaksi ini biasanya berlangsung selama 10-20 hari (Subagyo dkk., 2006).

Pada infeksi TB primer, *M. tuberculosis* masuk ke dalam makrofag secara endositosis yang dimediasi oleh reseptor mannosa makrofag yang berikatan dengan *mannose-capped glycolipid* pada dinding sel bakteri. Di dalam makrofag, bakteri tidak dihancurkan oleh makrofag karena organisme mampu menghambat respon mikrobisidal dengan cara memanipulasi pH endosomal dan menghentikan maturasi endosomal. Fungsi fagolisosom makrofag gagal membunuh bakteri sehingga bakteri dapat bertahan dan berproliferasi. Gen *natural resistance-associated makrophage protein-1* (NRAMPI) terlibat dalam aktivitas mikrobisidal dan variasi genotip gen ini dikatakan dapat menurunkan fungsi mikrobisidal. 3 minggu setelah paparan awal, antigen *Mycobacterium* mencapai nodus limfatik dan dipresentasikan pada MHC II oleh makrofag sehingga kemudian makrofag menghasilkan interleukin 12 yang berfungsi untuk mengubah sel T helper 0 (sel Th) menjadi T helper 1 CD4, dimana Th1 kemudian akan mensekresikan interferon gamma (*IFN gamma*). *IFN gamma* akan mengaktifasi makrofag sehingga mengeluarkan mediator berupa *Tumor Nekrosis Factor* (TNF) dan chemokin. TNF berfungsi untuk memanggil monosit yang kemudian berdiferensiasi menjadi histiosit

epiteloid yang merupakan ciri khas respon granulomatosa. IFN *gamma* dan TNF akan menstimulasi gen *inducible nitric oxide* (iNOS) yang akan meningkatkan level nitrit oksida dan radikal bebas dimana hal ini merupakan reaksi bakterisidal yang akan menghancurkan konstituen mycobakterium dari dinding sampai DNA (Subagyo dkk., 2006).

Nekrosis bagian sentral lesi memberikan gambaran relatif padat dan seperti keju disebut nekrosis kaseosa. Daerah yang mengalami nekrosis kaseosa dan jaringan granulasi di sekitarnya yang terdiri dari sel epiteloid dan fibroblas menimbulkan respon berbeda. Jaringan granulasi menjadi lebih fibrosa, membentuk jaringan parut kolagenosa yang akhirnya akan membentuk suatu kapsul yang mengelilingi tuberkel (Subagyo dkk., 2006).

Lesi primer paru disebut fokus *Ghon* dan gabungan terserangnya kelenjar getah bening regional dan lesi primer disebut kompleks *Ghon*. Kompleks *Ghon* yang mengalami perkapuran ini dapat dilihat pada orang sehat yang kebetulan menjalani pemeriksaan radiogram rutin. Namun kebanyakan infeksi TB paru tidak terlihat secara klinis atau dengan radiografi (Subagyo dkk., 2006).

Respon lain yang dapat terjadi pada daerah nekrosis adalah pencairan, yaitu bahan cair lepas ke dalam bronkus yang berhubungan dan menimbulkan kavitas. Bahan tuberkular yang dilepaskan dari dinding kavitas akan masuk dalam percabangan trakeobronkial. Proses ini dapat berulang kembali di bagian lain dari paru, atau basil dapat terbawa sampai ke laring, telinga tengah, atau usus (Subagyo dkk., 2006).

Walaupun tanpa pengobatan, kavitas yang kecil dapat menutup dan meninggalkan jaringan parut yang terdapat dekat dengan bronkus dan rongga. Bahan tuberkular dapat

mengental dan tidak dapat mengalir melalui saluran penghubung, sehingga kavitas penuh dengan bahan tuberkular, dan lesi mirip dengan lesi berkapsul yang tidak terlepas. Keadaan ini dapat tidak menimbulkan gejala dalam waktu lama atau membentuk lagi hubungan dengan bronkus dan menjadi tempat peradangan aktif (Subagyo dkk., 2006).

Penyakit dapat menyebar melalui getah bening atau pembuluh darah. Organisme yang lolos dari kelenjar getah bening akan mencapai aliran darah dalam jumlah kecil, yang kadang akan menimbulkan lesi pada berbagai organ lain. Jenis penyebaran ini dikenal sebagai penyebaran limfohematogen, yang biasanya sembuh sendiri. Penyebaran hematogen merupakan suatu fenomena akut yang biasanya menyebabkan TB milier; terjadi apabila fokus nekrotik merusak pembuluh darah sehingga banyak organisme masuk ke dalam sistem vaskular dan tersebar ke organ-organ tubuh (Subagyo dkk., 2006).

## 2.5 Mekanisme Proteksi Imun terhadap TB

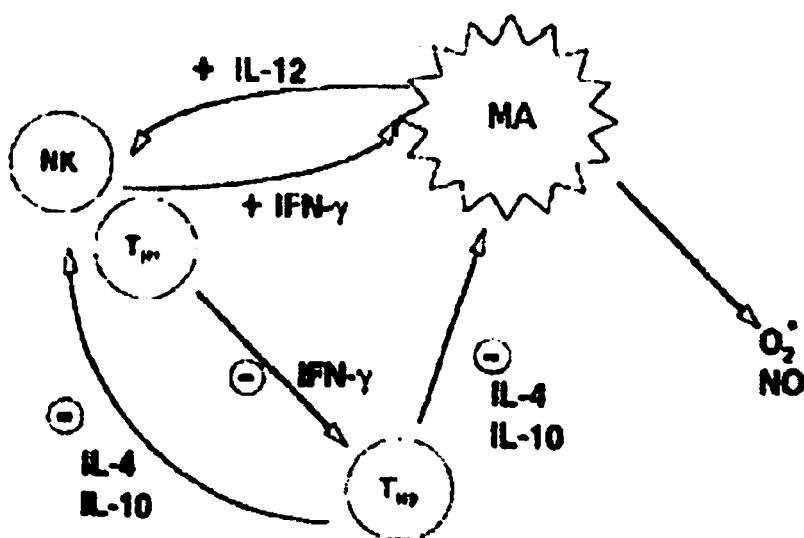
Tubuh manusia mempunyai suatu sistem imun yang bertujuan melindungi tubuh dari serangan benda asing seperti kuman, virus dan jamur. Sistem tersebut terdiri atas berbagai macam sel dan molekul protein yang sanggup membedakan antara *self antigen* dan *nonself antigen*. Setelah sistem imun dibangkitkan terhadap suatu antigen asing, sistem tersebut akan mempunyai *memory* atau daya ingat dan akan melakukan respons yang lebih spesifik serta lebih aktif jika antigen tersebut masuk ke dalam tubuh untuk kedua kalinya (Subagyo dkk., 2006).

Respons imun proteksi utama terhadap kuman intraseluler adalah *cell mediated immunity* (CMI) atau imunitas seluler. Imunitas seluler terdiri atas dua tipe reaksi yaitu fagositosis (oleh makrofag teraktivasi) dan lisis sel terinfeksi (oleh limfosit T sitolitik).

Kuman yang masuk ke alveoli akan ditelan dan sering dihancurkan oleh makrofag alveoler. Secara imunologis, sel makrofag dibedakan menjadi makrofag normal dan makrofag teraktivasi. Makrofag normal berperan pada pembangkitan daya tahan imunologis nonspesifik, dilengkapi dengan kemampuan bakterisidal atau bakteristatik terbatas. Makrofag ini berperan pada daya tahan imunologis bawaan (*innate resistance*). Sedang makrofag teraktivasi mempunyai kemampuan bakterisidal atau bakteristatik sangat kuat yang merupakan hasil aktivasi sel T sebagai bagian dari respons imun spesifik (*acquired resistance*). Sel T adalah mediator utama pertahanan imun melawan *M.tb*.<sup>15</sup> Secara imunofenotipik sel T terdiri dari limfosit T *helper*, disebut juga *clusters of differentiation 4* (CD4) karena mempunyai molekul CD4+ pada permukaannya, jumlahnya 65% dari limfosit T darah tepi. Sebagian kecil (35%) lainnya berupa limfosit T supresor atau sitotoksik, mempunyai molekul CD8+ pada permukaannya dan sering juga disebut CD8. Sel T *helper* (CD4) berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel T *helper 1* (Th1) dan sel T *helper 2* (Th2). Subset sel T tidak dapat dibedakan secara morfologik tetapi dapat dibedakan dari perbedaan sitokin yang diproduksinya. Sel Th1 membuat dan membebaskan sitokin tipe 1 meliputi IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  dan tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) (Subagyo dkk., 2006).

Sitokin yang dibebaskan oleh Th1 adalah aktivator yang efektif untuk membangkitkan respons imun seluler melalui pola Th1. Sel Th2 membuat dan membebaskan sitokin tipe 2 antara lain IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, dan IL-10. Sitokin tipe 2 menghambat proliferasi sel Th1, sebaliknya sitokin tipe 1 menghambat produksi dan pembebasan sitokin tipe 2 (Subagyo dkk., 2006). Interaksi makrofag dan limfosit dalam menghasilkan sitokin dapat di lihat pada Gambar 2.3.

Interaksi antara sel imun dan kuman dalam setiap lesi merupakan kelainan yang berdiri sendiri dan tidak dipengaruhi oleh lesi lainnya. Senjata sel imun dalam interaksi tersebut adalah makrofag teraktivasi dan sel sitotoksik. Makrofag teraktivasi dapat membunuh atau menghambat kuman yang ditelannya. Sel sitotoksik dapat secara langsung maupun tidak langsung membunuh makrofag tidak teraktivasi yang berisi kuman TB yang sedang membelah secara aktif dalam sitoplasmanya. Kematian makrofag tidak teraktivasi akan menghilangkan lingkungan intraseluler (tempat yang baik untuk tumbuh), diganti dengan lingkungan ekstraseluler berupa jaringan padat (nekrotik) yang akan mengambat pertumbuhan kuman (Subagyo dkk., 2006).



Gambar 2.3 Interaksi makrofag dan limfosit pada pasien tuberkulosis (Schluger dan Rom, 1998 dalam Subagyo, 2006)

Bakteri TB dalam interaksi tersebut mempunyai kemampuan untuk membelah secara logaritmik dalam makrofag tidak teraktivasi, misalnya dalam monosit yang baru saja migrasi dari aliran darah ke tempat infeksi. Kuman TB juga mempunyai kemampuan untuk membelah (kadang sangat cepat). Ketika kuman sedang membelah ekstraseluler, sejumlah besar antigen yang dihasilkannya menyebabkan nekrosis jaringan lebih banyak,



erosi dinding bronkus, pembentukan kaviti dan selanjutnya penyebaran kuman ke dalam saluran napas (Subagyo dkk., 2006).

## **2.6 Fase Pembentukan Respons Imun**

Selama beberapa hari atau minggu awal infeksi TB primer, respons kompleks sedang disiapkan oleh pejamu. Walaupun lekosit polimorfonuklear (PMN) telah aktif pada awal inflamasi namun mereka tidak bekerja dengan baik. Respons humoral atau antibodi yang biasanya merupakan pusat pertahanan terhadap bakteri patogen, peranannya bisa diabaikan dalam melawan tuberkulosis. Namun demikian sistem komplemen ikut berperan pada tahap awal fagositosis (Subagyo dkk., 2006).

Mekanisme pertahanan spesifik terjadi 4-8 minggu setelah infeksi berupa sensitisasi sel T terhadap antigen spesifik. Mekanisme tersebut pada tuberkulosis ditandai dengan dimulainya respons *cell-mediated immunity* (CMI) dan *delayed-type hypersensitivity* (DTH) yang akan meningkatkan kemampuan pejamu untuk menghambat atau mengeliminasi kuman. Respons CMI dan DTH merupakan fenomena yang sangat erat hubungannya dan timbul akibat aktivasi sel T yang bersifat spesifik. Kedua fenomena yang belum dapat dipisahkan tersebut terjadi melalui mekanisme respons imun yang sama dan akan mengubah respons sel imun terhadap paparan antigen berikutnya. Respons DTH ditandai dengan nekrosis akibat lisisnya sel makrofag alveoli yang belum teraktivasi, sedang respons CMI timbul setelah makrofag alveoli teraktivasi sehingga menjadi sel epiteloid matur (Subagyo dkk., 2006).

Penelitian pada binatang percobaan mendapatkan kesan bahwa kedua respons imun tersebut terjadi pada sel imun yang rentan maupun resisten tetapi dengan derajat

yang berbeda. Pada sel imun yang resisten didapatkan rasio sel-sel epiteloid terhadap nekrosis sel jauh lebih besar dibandingkan sel imun yang rentan (Subagyo dkk., 2006).

Keseimbangan antara CMI dan DTH akan menentukan bentuk penyakit yang akan berkembang. Respons CMI akan mengaktifkan makrofag dan selanjutnya membunuh kuman secara intraselular sedang respons DTH menyebabkan nekrosis perkijuan dan pertumbuhan kuman dihambat secara ekstraselular. Keduanya merupakan respons imun yang sangat efektif menghambat perjalanan penyakit. Untuk keberhasilan pengelolaan TB, diperlukan pengetahuan tentang saling pengaruh antara kedua respons imun tersebut dan perubahan rasio antara keduanya (Subagyo dkk., 2006).

Kuman *M. tuberculosis* dalam makrofag akan dipresentasikan ke sel Th1 melalui *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II. Sel Th1 selanjutnya akan mensekresi IFN- $\gamma$  yang akan mengaktifkan makrofag sehingga dapat menghancurkan kuman yang telah difagosit. Jika kuman tetap hidup dan melepas antigennya ke sitoplasma maka akan merangsang sel CD8 melalui MHC kelas I. Sel CD8 yang bersifat sitolitik selanjutnya akan melisiskan makrofag. Tidak semua makrofag akan teraktivasi oleh IFN- $\gamma$  yang dihasilkan oleh Th1 sehingga sel yang terlewat tersebut selanjutnya akan dilisiskan melalui mekanisme DTH (Subagyo dkk., 2006).

Sitokin IFN- $\gamma$  yang disekresi oleh Th1 tidak hanya berguna untuk meningkatkan kemampuan makrofag melisiskan kuman tetapi juga mempunyai efek penting lainnya yaitu merangsang sekresi TNF- $\alpha$  oleh sel makrofag. Hal ini terjadi karena substansi aktif dalam komponen dinding sel kuman yaitu *lipoarabinomannan* (LAM) yang dapat merangsang sel makrofag memproduksi TNF- $\alpha$ . Respons DTH pada infeksi TB ditandai dengan peningkatan sensitiviti makrofag tidak teraktivasi terhadap efek toksik TNF- $\alpha$ .

Makrofag tidak teraktivasi tersebut merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhan kuman, sehingga perlu dihancurkan untuk menghambat proliferasi kuman lebih lanjut (Subagyo dkk., 2006).

Perkembangan infeksi berhubungan dengan kemampuan makrofag sekitar lesi mengendalikan proliferasi dan penyebaran kuman TB. Pada hampir semua sel imun normal, lesi primer dalam paru akan membaik karena pengaruh pertahanan seluler atau CMI. Pada sebagian sel imun kemampuan meningkatkan respons imun lemah sehingga tidak mampu mengendalikan TB. Sel imun tersebut secara klinis akan menderita TB beberapa minggu sampai bulan sesudah infeksi primer. Termasuk dalam kelompok ini adalah bayi (sistem imun imatur), usia lanjut (kompetensi imun menurun dengan bertambahnya usia), dan *immunocompromised* (khususnya orang dengan human immunodeficiency virus / HIV atau acquired immunodeficiency syndrome / AIDS) (Subagyo dkk., 2006).

## BAB III HIPOTESIS, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian yang disusun berdasarkan kajian teori adalah sebagai berikut:

- a. PSK mampu memperbaiki kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten melalui meningkatkan jumlah total leukosit, jumlah makrofag dan gambaran histologis derivat-derivat leukosit pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*.
- b. PSK mampu mengembalikan dan atau memperkuat fungsi respon imun non-spesifik melalui uji fungsi fagositosis sel-sel makrofag secara *in vivo* pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*.
- c. PSK dapat mengembalikan dan atau memperkuat respon imun spesifik melalui pengukuran pengukuran kadar IFN- $\gamma$ , titer antibodi dan analisis isotipe imunoglobulin dengan teknik ELISA pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*.

### 3.2. Tujuan Penelitian

Tujuan akhir penelitian ini adalah memperoleh polisakarida krestin (PSK) yang diisolasi dari ekstrak jamur *Cariolus versicolor* isolat lokal dan mengetahui peranan PSK sebagai imunomodulator respon imun akibat infeksi bakteri *M. tuberculosis*.

Tujuan khusus dalam penelitian ini adalah:

- a. Menguji kemampuan PSK dalam memperbaiki kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten melalui peningkatan jumlah total leukosit, jumlah makrofag dan gambaran histologis derivat-derivat leukosit pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*.

- b. Menguji kemampuan PSK dalam mengembalikan dan atau memperkuat fungsi respon imun non-spesifik melalui uji fungsi fagositosis sel-sel makrofag secara *in vivo* pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*.
- c. Mengetahui kemampuan PSK dalam mengembalikan dan atau memperkuat respon imun spesifik melalui pengukuran kadar IFN- $\gamma$ , titer antibodi dan analisis isotope imunoglobulin dengan teknik ELISA pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*

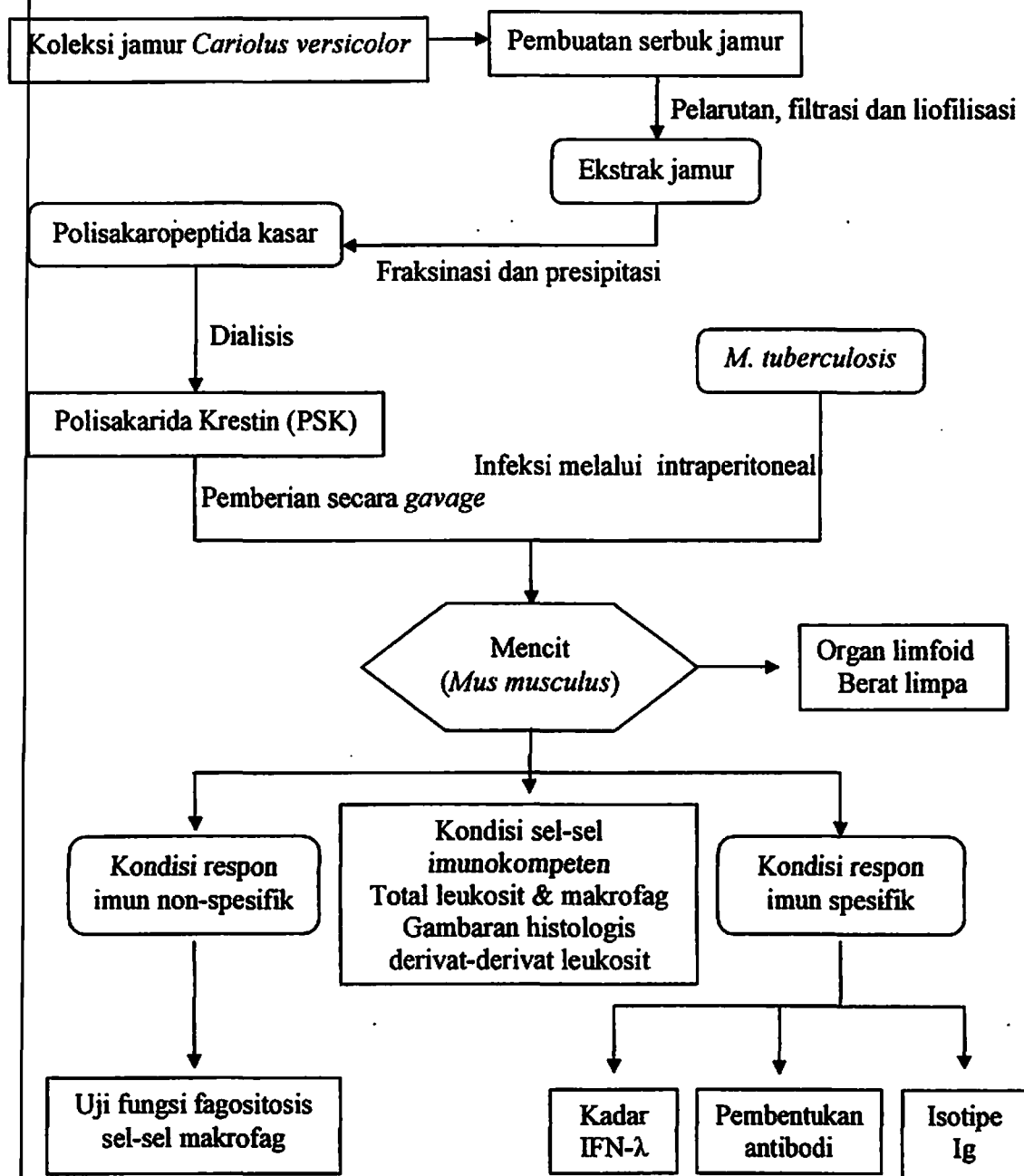
### 3.3. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini mencakup beberapa aspek, tidak hanya aspek hasil penelitian, kemajuan ilmu dan teknologi, tetapi juga salah satu usaha untuk meningkatkan proses belajar-mengajar, baik untuk staf pengajar dan mahasiswa, khususnya untuk pengembangan penelitian di Laboratorium Biologi Reproduksi.

Ditinjau dari segi keilmuan, berikut di bawah ini uraian keutamaan dari rencana penelitian ini. Hasil penelitian terutama bermanfaat untuk memberikan daya tahan tubuh sehingga dapat mencegah penularan penyakit TB paru akibat infeksi *M. tuberculosis*. Hal ini mengingat bahwa TBC adalah penyakit yang sangat perlu mendapat perhatian untuk ditanggulangi. Karena bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sangat mudah menular melalui udara pada saat pasien TBC batuk atau bersin, bahkan pada saat meludah dan berbicara. Satu penderita bisa menyebarkan bakteri TBC ke 10-15 orang dalam satu tahun. Pada umumnya, reaksi daya tahan tubuh dapat menghentikan perkembangan kuman TB. Jika daya tahan tubuh menurun maka kuman akan berkembang, akibatnya dalam beberapa bulan yang bersangkutan akan menjadi penderita Tuberkulosis.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### Bagan alir rencana penelitian



Gambar 4.1 Bagan alir penelitian

#### 4.1. Bahan Penelitian

Penelitian tersebut menggunakan mencit betina dewasa, jenis *Mus musculus* strain Balb/C, berumur 2-3 bulan, berat badan berkisar 30-40 g. Jamur *Coriolus versicolor* diperoleh dari alam, hidup di kayu-kayu dari tumbuhan yang telah mati. Bakteri *M. tuberculosis* diperoleh dari Bagian Mikrobiologi RS. Dr. Soetomo, Surabaya. Larutan untuk isolasi PSK dari ekstrak jamur *Coriolus versicolor* (akuades dan amonium sulfat/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Medium untuk menumbuhkan bakteri (Lowenstein Jensen). Larutan untuk pembuatan preparat histologis (Giemsa, metanol), larutan untuk pengukuran kadar karbohidrat (fenol dan asam sulfat/ $\text{NH}_2\text{SO}_4$ ), larutan untuk uji fungsi fagositosis sel-sel makrofag (Ziehl Neelsen), larutan untuk pengukuran kadar IFN- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$  ELISA kit* dari Bendermed), larutan untuk menguji pembentukan antibodi (*protein detector ELISA kit* dari KPL), dan larutan untuk penentuan isotype Ig (*isotype Ig kit*).

#### 4.2 Alat Penelitian

Kandang mencit berupa bak plastik dengan tutup dari kawat kasa sebanyak 6 bak, botol minum, tempat pakan, sekam, mikroskop cahaya, *petridish*, timbangan analitik dengan ketelitian 4 angka dibelakang koma, kuvet ukuran 1 ml, spektrofotometer UV-vis, gelas Beker, vakum, kertas Whatman no. 41, gelas obyek, gelas ukur, bunsen, haemositometer *Neubauer*, *eppendorf*, alat bedah, meja bedah, jarum injeksi ukuran 23G yang telah diberi timah, jarum injeksi 1 ml ukuran 16G untuk infeksi *M. tuberculosis* melalui intraperitoneal dan pengambilan sampel darah, jarum injeksi 3 ml, ELISA *plate* sumuran 96, ELISA *reader*, mikro pipet, tip (*white*, *blue*, dan *yellow tip*), pH meter, sentrifus suhu dingin, blender, alat *fresh drying*, dan tabung dialisis.

#### **4.3. Prosedur Penelitian**

##### **4.3.1. Koleksi dan pembuatan serbuk jamur *Coriolus versicolor***

Jamur *Coriolus versicolor* dikoleksi dari alam. Pada umumnya banyak ditemukan pada bongkahan kayu yang telah mati dan banyak tumbuh saat musim hujan. Selanjutnya jamur dikeringanginkan sampai kering dan dibuat serbuk kasar dengan blender.

##### **4.3.2. Pembuatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor***

Pembuatan ekstrak jamur dilakukan menurut metode Cui dan Chisti (2003) dan Cui *et al.* (2007). Serbuk kasar sebanyak 200 g ditambah akuades sebanyak 3 l dan dipanaskan pada suhu 80 - 98°C selama 2 - 3 jam. Selanjutnya dipisahkan antara bagian yang tidak terlarut (ampas) dari bagian yang terlarut. Ampas ditambahkan lagi dengan 2 l akuades dan dipanaskan pada suhu 80 - 98°C selama 2 - 3 jam. Bagian yang terlarut akuades disaring dengan kertas Whatman No. 41, sehingga didapatkan larutan jamur. Larutan jamur di keringkan dengan cara didinginkan dan dihisap atau dilakukan *fresh drying*. Selanjutnya didapatkan ekstrak jamur kering.

##### **4.3.3. Pembuatan polisakaropeptida kasar dan isolasi polisakarida krestin**

Ekstrak jamur diifraksinasi dan dipresipitasi dengan amonium sulfat. Sebelumnya dilakukan optimasi dari amonium sulfat. Amonium sulfat dibuat dengan konsentrasi 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 % sebanyak 1ml dan ditempatkn pada tabung *Eppendorf*. Ekstrak jamur sebanyak 0,01 g dimasukkan pada tabung dan dilakukan penggojogan selama 10 menit. Selanjutnya di lakukan sentrifugasi 9000 rpm selama 20 menit. Superntan dibuat, pelet diresuspensi dengan akuades 200 µl. Larutan pelet diukur kadar glukosanya dengan *phenol sulphuric acid assay*. Penentuan kadar karbohidrat berdasarkan kurva standart



(Lampiran 1). Kadar karbohidrat yang tinggi menjadi standart untuk penentuan konsentrasi amonium sulfat.

Ekstrak jamur dipresipitasi dengan amonium sulfat 90% (65,7 g amonium sulfat + 100 ml akuades + 2 gr ekstrak jamur kering). Pada proses ini akan dihasilkan polisakaropeptida kasar dan dilarutkan dengan larutan salin. Selanjutnya larutan didialisis selama 24 jam. Proses ini dihasilkan larutan PSK murni. Larutan PSK yang digunakan untuk perlakuan dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  perekor mencit.

#### **4.3.4. Isolasi dan perbanyakkan *M. tuberculosis***

Bakteri diisolasi dari dahak penderita TB dari pasien di Bagian Penyakit Paru, RS. Dr. Soetomo Surabaya. Bakteri ditumbuhkan pada media agar, suhu ruang, selama 6 minggu. Selanjutnya, bakteri yang tumbuh di larutkan dalam larutan garam fisiologis sampai konsentrasi 0,5 Mc. Farland ( $\text{OD}_{600} = 0,15$ ), jumlah bakteri sekitar  $1,5 \times 10^8$  sel. Laruttan bakteri digunakan untuk menginfeksi hewan coba. Infeksi sebanyak 2 kali dengan selang waktu 1 minggu.

#### **4.3.5. Pemberian PSK dan infeksi *M. tuberculosis* pada hewan coba**

Mencit ditempatkan pada kandang plastik tertutup kawat kasa, kondisi ruang/kandang hewan berventilasi dengan sistem penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Hewan coba diaklimasi selama seminggu dan selanjutnya dikelompokkan menjadi 6 kelompok.. Pembagian kelompok penelitian dapat di lihat pada Tabel 4.1.

Pemberian PSK dilakukan selama 7 hari berturut-turut *melalui gavage*. Infeksi *M. tuberculosis* dilakukan sebanyak 2 kali dengan selang waktu 1 minggu melalui intraperitoneal dan satu kali infeksi dilakukan 1 jam sebelum pengamatan.

Tabel 4.1. Pembagian kelompok dalam penelitian

| Kelompok Perlakuan | Pemberian PSK (hari ke1-7) | Infeksi <i>M. tuberculosis</i> (hari ke 8, 15) | Pemberian PSK (hari ke 16-22) |
|--------------------|----------------------------|--|-------------------------------|
| I                  | -                          | -  | -                             |
| II                 | +                          | -  | +                             |
| III                | -                          | +  | -                             |
| IV                 | +                          | +  | -                             |
| V                  | -                          | +  | +                             |
| VI                 | +                          | +  | +                             |

Keterangan: + menunjukkan adanya perlakuan

- menunjukkan tidak ada perlakuan, hanya diberi akuades

Kelompok perlakuan:

I : sebagai kontrol, tanpa pemberian PSK dan tanpa infeksi *M. tuberculosis*

II : sebagai kontrol positif, pemberian PSK saja

III : sebagai kontrol negatif, infeksi *M. tuberculosis* saja

IV : pemberian PSK sebelum infeksi *M. tuberculosis*.

V : pemberian PSK sesudah infeksi *M. tuberculosis*.

VI : pemberian PSK sebelum dan sesudah infeksi *M. tuberculosis*.

Setelah satu minggu dari pemberian PSK, darah jantung dari hewan coba diambil.

Selanjutnya, darah dibuat preparat histologis dengan cara hapusan darah, sebagian darah diberi EDTA, dan sebagian darah diisolasi serumnya. Darah-EDTA dilakukan pengamatan jumlah total leukosit.

Tahap pengambilan serum dilakukan dengan cara: 1) darah tanpa EDTA diambil melalui jantung, 2) darah ditampung dalam tabung *Eppendorf*, 3) darah dibiarkan semalam dalam suhu 4°C dalam keadaan miring, 4) darah disentrifus dengan kecepatan

3000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C hingga terbentuk dua fase, bagian atas berwarna kuning (serum) dan bagian bawah berwarna merah (darah), 5) serum dipisahkan dari darah dan digunakan untuk pengamatan respon imun spesifik.

Cairan intraperitoneal diambil dari cavum peritoneum dengan cara menyuntikkan saline yang mengandung EDTA sebanyak 3 ml. Kemudian menepuk-nepuk bagian perutnya. Cairan diambil lagi dari cavum. Cairan intra peritoneum digunakan untuk menghitung jumlah total makrofag dan pengamatan kondisi respon imun non-spesifik (pembuatan preparat untuk uji fungsi fagositosis).

#### **4.3.6. Pengamatan kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten**

Ada 4 pengamatan, yaitu berat limpa, jumlah total makrofag, jumlah total leukosit, dan gambaran histologis berbagai jenis sel darah putih.

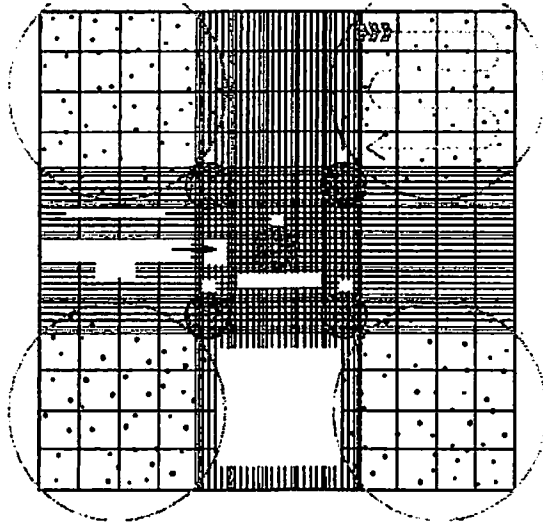
Limpa merupakan organ limfoid sekunder, sebagai tempat interaksi antara antigen dan antibodi. Limpa diambil setelah 1 minggu dari perlakuan terakhir. Limpa dihitung beratnya dengan timbangan analitik.

Penghitungan jumlah total makrofag dilakukan dengan cara sebagai berikut. Cairan makrofag diambil sebanyak 10 µl. Kemudian cairan tersebut diencerkan dengan larutan Turk sebanyak 100 µl. Selanjutnya diresuspensi selama 1 menit agar tercampur dengan baik. Cairan yang telah diencerkan ditetaskan di kanan dan kiri tepi bilik hitung *haemocytometer*, kemudian bilik hitung diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali dan makrofag dihitung dalam 4 kotak besar yang berada di sudut dari bilik hitung (Gambar 4.2).

Jumlah bujur sangkar kecil yang dihitung = 64 bujur sangkar

Luas setiap bujur sangkar kecil =  $1/16 \text{ mm}^2$

|                                   |                         |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Tinggi bilik hitung               | = 1/10 mm               |
| Volume setiap bujur sangkar kecil | = 1/160 mm <sup>3</sup> |
| Pengenceran                       | = 3 x 10 = 30 kali      |
| Jumlah makrofag yang terhitung    | = M                     |
| Jumlah makrofag / mm <sup>3</sup> | = M/ 64 x 160 x 30      |



Gambar 4.2 *Haemocytometer Improve Neubauer*, yang dihitung adalah bagian yang dilingkari dengan warna biru (Fankhauser, 2003).

Jumlah total sel darah putih dihitung dengan haemositometer *Neubauer* dengan cara mengencerkan darah + EDTA hewan uji dengan larutan Turk. Sampel darah diambil sebanyak 10  $\mu$ l. Kemudian darah tersebut diencerkan dengan larutan Turk sebanyak 100  $\mu$ l. Selanjutnya diresuspensi selama 1 menit agar tercampur dengan baik. Cara pengamatan sama dengan penghitungan jumlah total makrofag, hanya pengenceran sebanyak 10 kali sehingga rumus yang digunakan adalah:

|                                   |                     |
|-----------------------------------|---------------------|
| Jumlah leukosit / mm <sup>3</sup> | = L / 64 x 160 x 10 |
| Jumlah leukosit yang terhitung    | = L                 |

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Pengamatan kondisi limpa dan sel-sel imunokompeten

#### 5.1.1. Berat limpa

Limpa merupakan organ limfoid sekunder yang terbesar, mengandung limfosit T, limfosit B, makrofag, dan *antigen presenting cell*. Berdasarkan hasil uji statistik menunjukkan bahwa data berat limpa berdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya diuji anova, ternyata tidak ada perbedaan yang nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ) (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Rerata berat limpa mencit pada berbagai perlakuan dan uji statistiknya

| Replikasi | Berat limpa (g) pada kelompok perlakuan |          |          |          |          |          |
|-----------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
|           | I                                       | II       | III      | IV       | V        | VI       |
| 1         | 0,2976                                  | 0,2622   | 0,3916   | 0,3142   | 0,2806   | 0,3091   |
| 2         | 0,3089                                  | 0,3285   | 0,3335   | 0,2964   | 0,2994   | 0,2034   |
| 3         | 0,2348                                  | 0,2550   | 0,2877   | 0,2367   | 0,2751   | 0,2838   |
| 4         | 0,2444                                  | 0,2250   | 0,2942   | 0,2468   | 0,2530   | 0,3173   |
| 5         | 0,2862                                  | 0,3124   | 0,2013   | 0,3181   | 0,2854   | 0,2657   |
| Rata-rata | 0,2744 a                                | 0,2766 a | 0,3017 a | 0,2824 a | 0,2787 a | 0,2759 a |
| SD        | 0,03292                                 | 0,04275  | 0,06969  | 0,03820  | 0,01696  | 0,04538  |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Jika dilihat data rerata berat limpa pada masing-masing kelompok terlihat bahwa berat limpa pada kontrol negatif (hewan coba hanya diinjeksi *M. tuberculosis*/III) cenderung naik. Pada kelompok perlakuan lainnya (II, IV, V, dan VI) cenderung mirip kontrol (I). Walaupun perbedaannya tidak signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa

adanya bakteri patogen cenderung membuat limpa bengkak, sedangkan pemberian PSK sebelum dan atau sesudah paparan bakteri patogen dapat mengembalikan kondisi limpa seperti semula.

### 5.1.2. Jumlah total leukosit

Leukosit merupakan sel darah yang mengandung inti. Jumlah leukosit rata-rata pada darah mencit jantan adalah 7.689 – 12.811 sel/mm<sup>3</sup> dan pada mencit betina sebesar 5.522 – 9.522 sel/mm<sup>3</sup> (Sulaksono, 1994). Rerata jumlah leukosit dapat di lihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata jumlah total leukosit dan hasil uji statistiknya

| Replikasi | Jumlah total leukosit (sel/mm <sup>3</sup> ) pada kelompok perlakuan |           |            |            |           |           |
|-----------|--|-----------|------------|------------|-----------|-----------|
|           | I  | II        | III        | IV         | V         | VI        |
| 1         | 6.700  | 6.650     | 10.350     | 9.800      | 8.100     | 9.530     |
| 2         | 6.500  | 6.300     | 15.600     | 9.925      | 7.800     | 9.400     |
| 3         | 5.300  | 5.650     | 10.880     | 11.475     | 6.660     | 9.850     |
| 4         | 5.830  | 5.860     | 13.060     | 9.850      | 8.210     | 9.610     |
| 5         | 6.020  | 5.050     | 13.410     | 10.080     | 7.640     | 8.900     |
| Rata-rata | 6.070,0 a  | 5.902,0 a | 12.660,0 b | 10.226,0 b | 7.682,0 c | 9.458,0 b |
| SD        | 555,61   | 614,22    | 2113,68    | 706,18     | 615,16    | 352,38    |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Rerata jumlah total leukosit pada mencit betina kontrol (I) sebesar 6070,0 ± 555,61 sel/mm<sup>3</sup> dan pemberian PSK saja (kontrol positif, II) 59.902,0 ± 614,22 sel/mm<sup>3</sup> dalam keadaan normal. Rerata jumlah leukosit diantara kelompok I dan II berbeda tetapi tidak signifikan. Pada kelompok III (kontrol negatif) yang hanya diberi paparan bakteri TB, rerata jumlah total leukosit lebih tinggi dibandingkan normal. Hal tersebut menandakan adanya perlawanan sistem imun terhadap infeksi bakteri. Pada kelompok IV

(pemberian PSK sebelum infeksi bakteri) dan VI (pemberian PSK sebelum dan sesudah infeksi bakteri), rerata jumlah total leukosit masih tinggi dan berbeda tidak signifikan dengan kelompok III tetapi berbeda nyata dengan kelompok I dan II.. Pada kelompok V (pemberian PSK setelah infeksi bakteri) juga menunjukkan adanya peningkatan terhadap jumlah leukosit dibandingkan kontrol I dan II tetapi lebih rendah dibandingkan dengan kelompok III.

### 5.1.3 Jumlah total makrofag

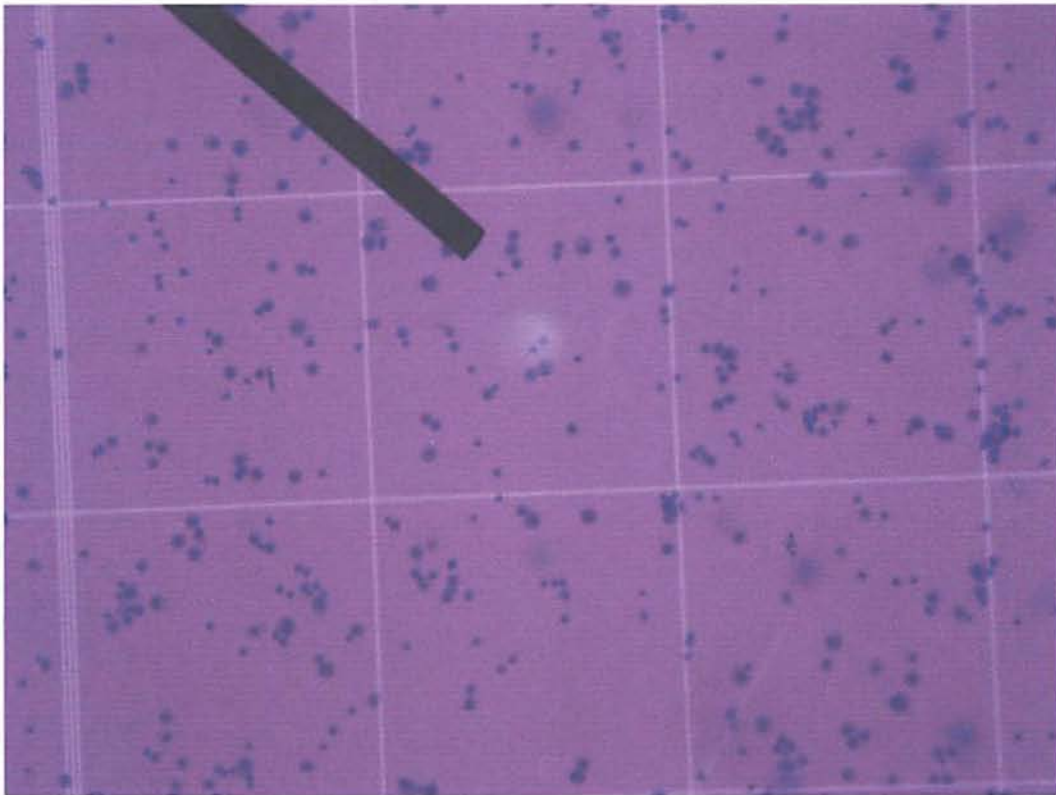
Makrofag merupakan bagian dari imunitas seluler non spesifik. Makrofag dapat bekerjasama dengan antibodi untuk melisis sel asing. Aktivitas ini disebut *antibody dependent cell mediated cytotoxicity* (ADCC, sitotoksitas berperantara sel yang tergantung antibodi) (Abbas *et al.*, 2000). Makrofag memproduksi berbagai macam substansi, diantaranya adalah oksigen reaktif dan nitrogen oksida. Kedua gas ini akan menghambat pertumbuhan dan membunuh kuman. Makrofag juga menghasilkan IL-12. Rerata jumlah makrofag dapat dilihat pada Tabel 5.3. Cara menghitung makrofag dengan haemositometer dapat di lihat pada Gambar 5.1,

Rerata jumlah makrofag pada kontrol (I) dan kontrol positif (II) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (III), IV, V, VI.. Rerata jumlah makrofag terbesar pada kelompok III dan IV. Menurut Effendi (2003), limfosit T menghasilkan sejumlah limfokin yang menarik makrofag ke tempat yang membutuhkan dan terus mengaktifkannya selama proses infeksi. Pada kelompok V dan VI, rerata jumlah makrofag lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok I dan II tetapi lebih rendah dibandingkan dengan kelompok III dan IV.

Tabel 5.3. Rerata jumlah total makrofag dan uji statistiknya

| Replikasi | Jumlah total makrofag (sel/mm <sup>3</sup> ) pada kelompok perlakuan |          |           |          |          |          |
|-----------|--|----------|-----------|----------|----------|----------|
|           | I  | II       | III       | IV       | V        | VI       |
| 1         | 26.400   | 16.500   | 61.650    | 72.075   | 33.390   | 37.650   |
| 2         | 28.680   | 19.500   | 58.590    | 69.150   | 34.650   | 46.890   |
| 3         | 27.480   | 18.375   | 84.540    | 71.175   | 32.100   | 34.440   |
| 4         | 29.250   | 21.150   | 74.100    | 66.900   | 30.840   | 37.590   |
| 5         | 25.500   | 21.825   | 61.890    | 86.775   | 35.250   | 45.840   |
| Rata-rata | 27.462 a   | 19.470 b | 68.154 c  | 73.215 c | 33.246 d | 40.482 d |
| SD        | 1.553,87   | 2.144,13 | 10.918,63 | 7.838,02 | 1.810,40 | 5.537,61 |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan



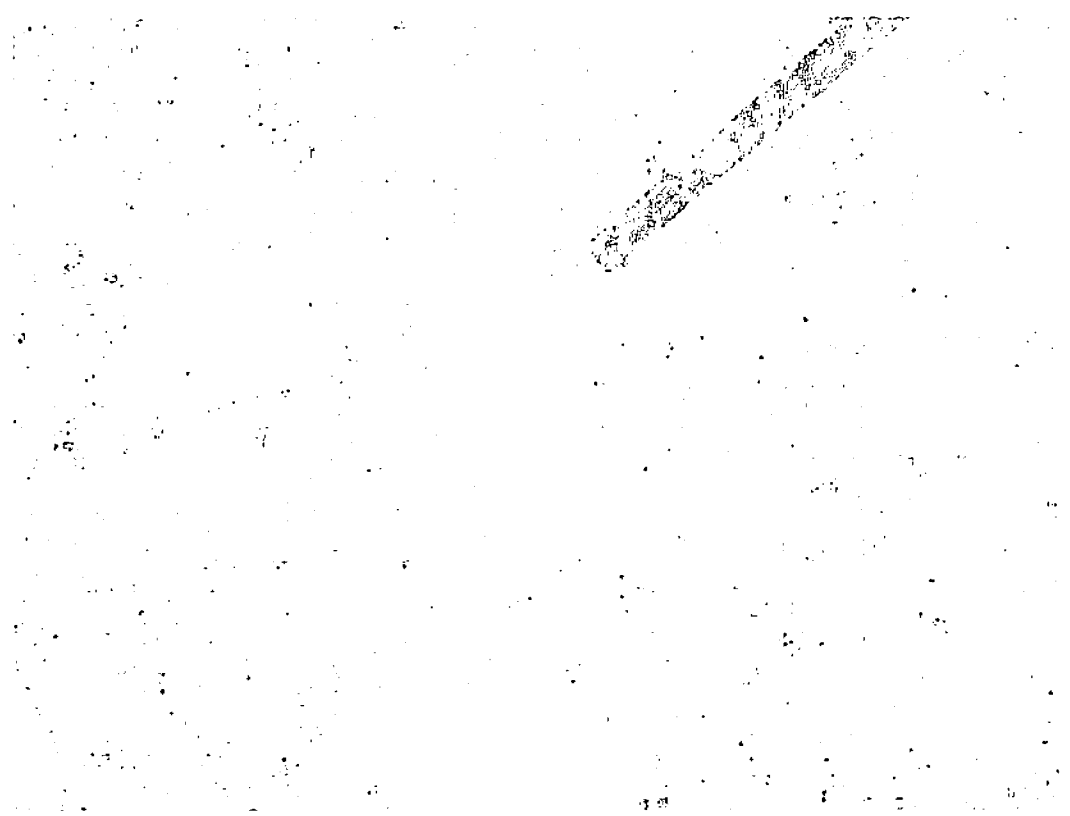
Gambar 5.1. Sel makrofag dalam haemositometer pada penghitungan jumlah total makrofag



1.2.2. Bentuk jumlah total masing-masing jenis sumberdaya

|   | jumlah total masing-masing jenis sumberdaya |          |          |          |         |         |
|---|---|----------|----------|----------|---------|---------|
|   | IV  | V        | VI       | III      | II      | I       |
| 1 | 27.000                                      | 27.000   | 27.000   | 27.000   | 27.000  | 27.000  |
| 2 | 40.000                                      | 39.000   | 39.120   | 39.200   | 39.300  | 39.400  |
| 3 | 29.400                                      | 29.100   | 29.100   | 29.100   | 29.100  | 29.100  |
| 4 | 27.000                                      | 27.000   | 27.000   | 27.000   | 27.000  | 27.000  |
| 5 | 27.000                                      | 27.000   | 27.000   | 27.000   | 27.000  | 27.000  |
| 6 | 10.425,4                                    | 10.240,4 | 10.117,5 | 10.000,0 | 9.875,0 | 9.750,0 |
| 7 | 2.810,1                                     | 2.810,1  | 2.810,1  | 2.810,1  | 2.810,1 | 2.810,1 |

jumlah total masing-masing jenis sumberdaya yang terdistribusi ke dalam masing-masing jenis sumberdaya



jumlah total masing-masing jenis sumberdaya yang terdistribusi ke dalam masing-masing jenis sumberdaya

Adanya  $\beta$ -glukan dapat menunda terjadinya apoptosis dan membantu meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel makrofag, sehingga sel makrofag meningkat. Menurut Meira (1996), adanya  $\beta$ -glukan dapat meningkatkan respon imun dengan menstimulasi makrofag terutama peningkatan jumlah, ukuran, dan fungsinya. Disamping itu,  $\beta$ -glukan menstimulasi sekresi lisozim dan TNF oleh makrofag aktif, peningkatan fagositosis terhadap antigen, aktivasi granulosit dan monosit, serta meningkatkan aktivitas limfosit B dan T.

#### 5.1.4. Gambaran histologis derivat-derivat leukosit

Limfosit merupakan sel yang sferis, garis tengah 20-30  $\mu\text{m}$ , berjumlah 20-30 % dari total leukosit dalam darah. Dalam keadaan normal, inti relatif besar, bulat dan sedikit cekung pada satu sisi, kromatin inti padat, anak inti baru terlihat dengan mikroskop elektron. Sitoplasma sedikit sekali, sedikit basofilik, mengandung granula azurofilik. Dalam sirkulasi darah normal limfosit dapat berukuran 10-12  $\mu\text{m}$  (Effendi, 2003).

Menurut Gartner dan Hiatt (2000), dan Effendi (2003), terdapat tiga tipe limfosit yang morfologinya tidak dapat dibedakan, yaitu limfosit B, limfosit T dan *null cell*. Sel T biasanya dikenal sebagai respon imun seluler dan mempunyai reseptor permukaan yang spesifik untuk mengenal antigen asing. Sel B berfungsi pada respon imun humoral, sel ini akan memproduksi antibodi yang beredar dalam darah dan secara khusus mengikat antigen asing yang menyebabkan antigen asing tersebut akan tersalut antibodi. Kompleks ini mempertinggi fagositosis, lisis dan *killer cells* (sel K). *Null cell*, jumlahnya sedikit, dan ada dua tipe yaitu, *pluripotential hemopoietic stem cells* dan *natural killer cells*. Rerata persentase limfosit pada berbagai perlakuan dapat di lihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Rerata persentase limfosit dan uji statistiknya

| Replikasi | Persentase limfosit (%) pada kelompok perlakuan |         |         |         |         |         |
|-----------|---|---------|---------|---------|---------|---------|
|           | I   | II      | III     | IV      | V       | VI      |
| 1         | 32,5  | 60,9    | 85,7    | 71      | 82,8    | 77,5    |
| 2         | 37,9  | 66,5    | 83,6    | 69.1    | 77,2    | 75,8    |
| 3         | 37,6  | 53,2    | 86,1    | 73      | 82,0    | 75,7    |
| 4         | 34,4  | 61,6    | 86,1    | 72.8    | 76,7    | 74,5    |
| 5         | 30,8  | 59,3    | 84,4    | 68.3    | 77,1    | 71,0    |
| Rata-rata | 34,60 a   | 60,30 b | 85,18 f | 70.84 c | 79,16 e | 74,90 d |
| SD        | 3,11  | 4,79    | 1,126   | 2.122   | 2,98    | 2,43    |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Rerata persentasi limfosit pada kontrol (I) 34,60% mirip dengan jumlah kisaran limfosit, yaitu sekitar 20-30%. Pada kontrol positif (II) lebih tinggi (60,3%), berbeda nyata dengan kontrol. Pada kontrol negatif (III) paling tinggi (85,18%), berbeda nyata dengan kontrol (I) dan perlakuan pemberian PSK (IV,V, dan VI). Sedangkan pada pemberian PSK sebelum (70,84%), sesudah (79,16%), dan sebelum dan sesudah paparan (74,90%) bakteri TB lebih tinggi dan berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol, tetapi lebih rendah dibandingkan kontrol negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian PSK menstimulasi pembentukan respon imun, tetapi juga dapat meregulasi respon imun sehingga respon tidak sampai berlebih.

Monosit merupakan leukosit yang jumlahnya 3-8 % dari jumlah lekosit normal. Diameternya 9-10  $\mu\text{m}$  tapi pada sediaan darah kering diameternya mencapai 20  $\mu\text{m}$ , atau lebih. Inti biasanya eksentris, adanya lekukan yang dalam berbentuk tapal kuda. Monosit beredar melalui aliran darah, menembus dinding kapiler masuk dalam jaringan penyambung. Berada di dalam darah beberapa hari, kemudian masuk dalam jaringan dan

bereaksi dengan limfosit, yang berfungsi dalam pengenalan dan interaksi sel-sel imunokompeten dengan antigen (Effendi, 2003). Rerata persentase monosit dapat di lihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5. Rerata persentase monosit dan uji statistiknya

| Replikasi | Persentase monosit (%) pada kelompok perlakuan |         |        |        |        |         |
|-----------|--|---------|--------|--------|--------|---------|
|           | I  | II      | III    | IV     | V      | VI      |
| 1         | 17,1   | 15,8    | 5,7    | 8,2    | 4,5    | 6,2     |
| 2         | 20,9   | 15,7    | 5,3    | 8,3    | 6,6    | 9,4     |
| 3         | 19,2   | 16,6    | 5,6    | 7,0    | 5,2    | 6,7     |
| 4         | 17,2   | 15,7    | 5,0    | 8,0    | 4,6    | 6,3     |
| 5         | 23,1   | 18,8    | 7,3    | 10,3   | 6,1    | 7,8     |
| Rata-rata | 19,50 d  | 16,52 c | 5,78 a | 8,36 b | 5,40 a | 7,28 ab |
| SD        | 2,550  | 1,329   | 0,893  | 1,201  | 0,925  | 1,344   |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Persentase monosit pada kontrol (I) dan kontrol positif (II) berbeda nyata dan lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif (III) dan pemberian PSK (IV, V, dan VI). Keberadaan monosit yang tinggi di pembuluh darah mencit kontrol dan kontrol positif menunjukkan bahwa monosit masih beredar di pembuluh darah dan belum menembus kapiler karena memang tidak diberi infeksi *M. tuberculosis*. Keberadaan monosit yang rendah pada kelompok III, IV, V, dan VI menunjukkan bahwa sebagian besar monosit sudah menembus kapiler dan masuk ke jaringan karena ada infeksi *M. tuberculosis*.

Jumlah eosinofil hanya 1-4 % leukosit darah, mempunyai garis tengah 9  $\mu\text{m}$  (sedikit lebih kecil dari netrofil). Inti biasanya berlobus dua. Eosinofil mempunyai pergerakan amoeboid, dan mampu melakukan fagositosis, lebih lambat tapi lebih selektif

dibanding neutrofil. Eosinofil menfagositosis kompleks antigen dan antibodi. Ini merupakan fungsi eosinofil untuk melakukan fagositosis selektif terhadap kompleks antigen dan antibodi (Effendi, 2003). Rerata persentase eosinofil dapat di lihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6. Rerata persentase eosinofil dan uji statistiknya

| Replikasi | Persentase eosinofil (%) pada kelompok perlakuan |         |        |        |         |         |
|-----------|--|---------|--------|--------|---------|---------|
|           | I  | II      | III    | IV     | V       | VI      |
| 1         | 15,6   | 4,9     | 1,3    | 7,9    | 2,8     | 4,5     |
| 2         | 13,6   | 4,6     | 2,9    | 8,4    | 4,1     | 3,6     |
| 3         | 15,4   | 7,6     | 2,3    | 7,3    | 3,1     | 3,8     |
| 4         | 20,1   | 7,0     | 2,6    | 5,9    | 3,5     | 4,3     |
| 5         | 17,1   | 7,3     | 2,1    | 5,8    | 3,4     | 4,7     |
| Rata-rata | 16,40 a  | 6,28 bd | 2,24 c | 7,06 b | 3,38 ce | 4,18 de |
| SD        | 2,430  | 1,417   | 0,607  | 1,172  | 0,487   | 0,466   |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Rerata eosinofil pada kontrol positif (II), kontrol negatif (III) dan pemberian PSK (III, IV, V, dan VI) berbeda nyata secara signifikan dengan kontrol (I), yaitu lebih rendah daripada kontrol. Pada kelompok III berbeda nyata dengan kelompok IV tetapi berbeda tidak nyata dibandingkan dengan kontrol positif (II). Kecilnya jumlah eosinofil dalam darah kemungkinan karena lisisnya sel eosinofil karena terpapar *M. tuberculosis*.

Basofil jumlahnya 0-1 % dari leukosit darah, ukuran garis tengah 12  $\mu\text{m}$ , inti satu, besar dengan bentuk irreguler, umumnya bentuk S. Granul basofil metakromatik dan mensekresi histamin dan heparin, dan keadaan tertentu, basofil merupakan sel utama pada tempat peradangan (Effendi, 2003). Rerata persentase basofil dapat di lihat pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7. Rerata persentase basofil dan uji statistiknya

| Replikasi | Persentase basofil (%) pada kelompok perlakuan |          |        |         |         |         |
|-----------|--|----------|--------|---------|---------|---------|
|           | I  | II       | III    | IV      | V       | VI      |
| 1         | 5,5  | 3,3      | 0,8    | 2,3     | 1,9     | 2,7     |
| 2         | 9,2  | 3,2      | 2,2    | 3,6     | 2,5     | 1,9     |
| 3         | 7,1  | 6,5      | 1,3    | 3,2     | 2,2     | 2,5     |
| 4         | 5,1  | 3,0      | 0,9    | 2,9     | 2,3     | 2,1     |
| 5         | 9,1  | 2,3      | 1,1    | 3,2     | 2,2     | 2,5     |
| Rata-rata | 7,20 a   | 3,66 acd | 1,26 c | 3,04 bd | 2,22 cb | 2,34 cb |
| SD        | 1,930  | 1,635    | 0,561  | 0,483   | 0,217   | 0,33    |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Basofil merupakan sel leukosit dengan persentase yang paling rendah. Basofil pada kontrol berbeda secara signifikan dengan kelompok II, III, IV, V, dan VI. Basofil pada kontrol positif (II) berbeda secara tidak signifikan dengan kelompok IV, V, dan VI. Persentase basofil terendah ditemukan pada kontrol negatif (III).

Neutrofil berkembang dalam sumsum tulang, dikeluarkan dalam sirkulasi, sel-sel ini merupakan 60-70 % dari leukosit yang beredar. Garis tengah sekitar 12  $\mu\text{m}$ , satu inti dan memiliki 2-5 lobus. Neutrofil merupakan garis depan pertahanan seluler terhadap invasi jasad renik, menfagosit partikel kecil dengan aktif (Effendi, 2003). Rerata persentase neutrofil dapat di lihat pada Tabel 5.8.

Rerata persentase neutrofil pada kontrol (I) berbeda nyata dengan kelompok II, III, IV, V, dan VI. Neutrofil kontrol lebih tinggi dengan kelompok lainnya. Persentase kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kelompok IV, V, dan VI, tetapi berbeda tidak nyata dengan kelompok kontrol negatif (III). Persentase jumlah neutrofil paling kecil pada kelompok III. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian PSK baik sebelum dan atau

sesudah infeksi TB dapat memperbaiki respon imun dengan lebih meningkatkan jumlah neutrofil walaupun kenaikannya masih belum menyamai seperti pada kontrol. Menurut Tzianobos (2000),  $\beta$ -1,3 glukon dapat memperbanyak jumlah neutrofil dan meningkatkan proliferasi sumsum tulang.

Tabel 5.8. Rerata persentase neutrofil dan uji statistiknya

| Replikasi | Rerata persentase neutrofil (%) pada kelompok perlakuan |         |         |        |         |         |
|-----------|---|---------|---------|--------|---------|---------|
|           | I   | II      | III     | IV     | V       | VI      |
| 1         | 29,3  | 15,1    | 6,6     | 10,6   | 8,1     | 9,1     |
| 2         | 18,4  | 10,1    | 6,1     | 10,6   | 9,6     | 9,3     |
| 3         | 20,7  | 16,2    | 4,7     | 9,6    | 7,5     | 11,2    |
| 4         | 23,2  | 12,7    | 5,4     | 10,4   | 12,9    | 12,9    |
| 5         | 19,9  | 12,3    | 5,1     | 12,3   | 11,2    | 14,0    |
| Rata-rata | 22,30 a   | 13,28 b | 5,58 cd | 10,7 b | 9,86 bd | 11,30 b |
| SD        | 4,280   | 2,411   | 0,766   | 0,985  | 2,223   | 2,160   |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

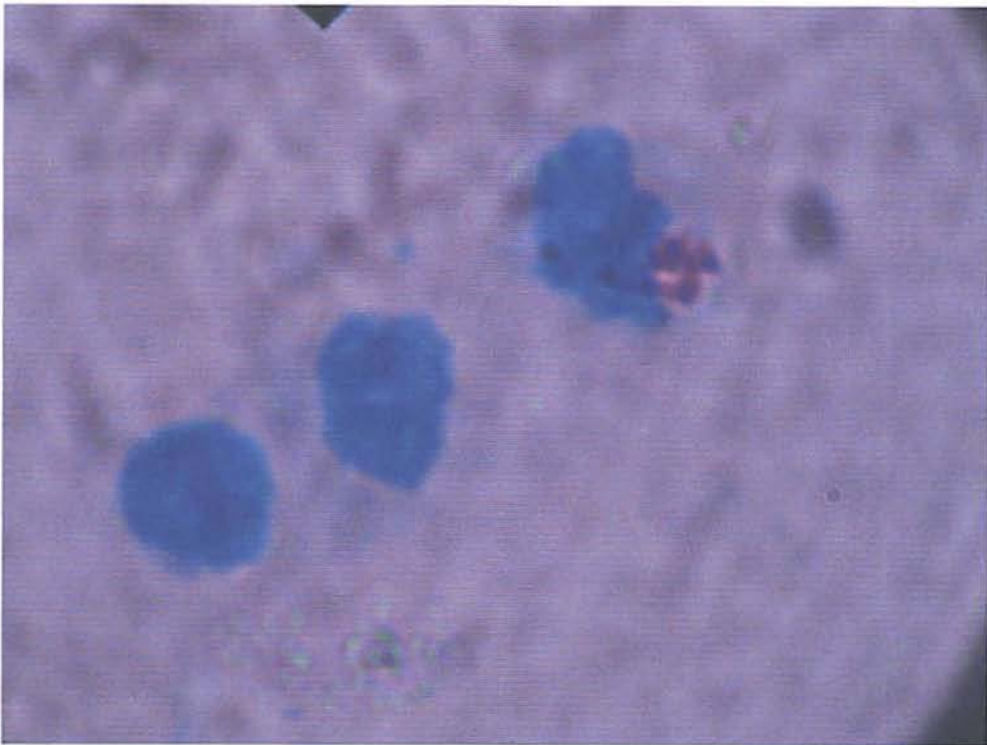
## 5.2. Pengamatan kondisi respon imun non-spesifik

Daya tahan tubuh terhadap mikroorganismen patogen erat kaitannya dengan lemahnya *immunologic surveillance* yang dilakukan oleh sistem imun baik selular maupun humoral. Menurut Safitri (2000), peningkatan aktivitas sistem imun sekarang ini berkembang ke arah penggunaan bahan alam sebagai imunostimulator. Menurut kaidah keilmuaan yang berlaku, segala informasi yang berhubungan dengan kandungan senyawa aktif dan mekanisme kerjanya yang terkandung dalam bahan alam menjadi sangat penting dalam upaya penapisan bahan alam sebagai imunostimulator.

Salah satu petanda terjadinya peningkatan *immunologic surveillance*, adalah peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. Makrofag merupakan salah

satu sel yang berperan penting dalam respon imun, baik perperan fungsional dalam fagositosis maupun perannya sebagai *antigen presenting cells* (APC) (Abbas *et al.*, 2000). Dalam melakukan kedua peran tersebut, bantuan mediator endogen seperti sitokin, sudah pasti dibutuhkan. Sedangkan kebutuhan akan mediator eksogen seperti  $\beta$ -glukan dari polisakarida krestin masih perlu dikaji lebih mendalam.

Pada penelitian ini, uji fagositosis dilaksanakan secara *in-vivo*. Indikator pengamatannya adalah dengan mengukur aktivitas dan kapasitas fagositosis. Sel makrofag yang sedang melakukan akitivitas fagositosis pada sel bakteri *M. tuberculosis* dapat di lihat pada Gambar 4.2. Rerata aktivitas fagositosis pada sel makrofag dapat di lihat pada Tabel 5.9.



Gambar 5.2. Makrofag sedang melakukan aktivitas fagositosis terhadap sel bakteri *M. tuberculosis* (sel paling atas). Dua sel dibawahnya adalah sel makrofag yang non aktif.



Tabel 5.9. Rerata aktivitas fagositosis sel makrofag dan uji statistiknya

| Replikasi | Rerata aktivitas fagositosis makrofag (%) pada kelompok perlakuan |         |         |         |         |         |
|-----------|---|---------|---------|---------|---------|---------|
|           | I   | II      | III     | IV      | V       | VI      |
| 1         | 4.0   | 10.5    | 4.0     | 5.5     | 5.5     | 18.5    |
| 2         | 5.5   | 11.5    | 9.0     | 6.5     | 8.0     | 14.5    |
| 3         | 6.5   | 8.5     | 9.0     | 7.0     | 9.0     | 15.0    |
| 4         | 5.5   | 11.0    | 7.5     | 6.5     | 8.0     | 14.5    |
| 5         | 5.4   | 11.5    | 15.0    | 6.4     | 8.5     | 15.5    |
| Rata-rata | 5.38 a  | 10.60 c | 8.90 bc | 6.38 ab | 7.80 ab | 15.60 d |
| SD        | 0.893   | 1.245   | 3.975   | 0.545   | 1.350   | 1.673   |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Rerata persentase makrofag yang sedang melakukan pada kontrol (I) berbeda nyata dengan kelompok II, III, dan VI. Kelompok kontrol positif (II) berbeda nyata dengan kelompok III, IV, V, dan VI. Dibandingkan dengan kelompok III, IV, dan V, maka kontrol positif masih lebih banyak sel makrofag yang sedang melakukan aktivitas fagositosis. Pada kelompok pemberian PSK sebelum dan sesudah infeksi TB, persentase aktivitas sel makrofag paling tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa PSK mampu merangsang sel makrofag untuk memakan kuman penyakit. Menurut Tzianabos (2000), PSK dalam ekstrak jamur *Coriolus versicolor* berpotensi sebagai imunostimulator dengan aktivitas spesifik untuk sel T dan *antigen-presenting cells* (APC) seperti monosit dan makrofag

Uji fagositosis yang kedua adalah dengan melihat kapasitas fagositosis, yaitu kemampuan satu sel makrofag dapat menfagositosis bakteri TB. Rerata kapasitas makrofag dapat di lihat pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10. Rerata kapasitas fagositosis sel makrofag

| Replikasi | Rerata kapasitas fagositosis makrofag (sel bakteri/50 fagosit)<br>pada kelompok perlakuan |          |         |          |          |          |
|-----------|---|----------|---------|----------|----------|----------|
|           | I   | II       | III     | IV       | V        | VI       |
| 1         | 87.5  | 106.0    | 81.0    | 109.5    | 147.5    | 130.5    |
| 2         | 73.0  | 100.5    | 91.0    | 92.0     | 131.5    | 122.5    |
| 3         | 86.5  | 93.0     | 88.0    | 99.5     | 118.0    | 132.5    |
| 4         | 78.5  | 106.0    | 98.0    | 102.0    | 132.5    | 138.5    |
| 5         | 81.4  | 109.0    | 95.0    | 100.8    | 130.0    | 122.5    |
| Rata-rata | 81.38 a   | 102.90 b | 90.60 a | 100.76 b | 131.90 c | 129.30 c |
| SD        | 5.962   | 6.329    | 6.580   | 6.250    | 10.500   | 6.870    |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa satu sel makrofag mampu menfagosit lebih dari satu sel bakteri. Pada kontrol, sebanyak 81,38 sel bakteri *M. tuberculosis* dapat difagositosis oleh 50 sel makrofag. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (II), jumlah bakteri yang mampu dimakan makrofag lebih banyak lagi dan berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol. Pada pemberian PSK setelah infeksi TB dan pemberian PSK sebelum dan setelah pemberian PSK, satu makrofag lebih banyak lagi menfagositosis bakteri TB. Sebanyak 129,30 – 131,90 sel bakteri mampu dimakan oleh 50 sel makrofag. Kelompok V dan VI tersebut berbeda nyata dengan kontrol (I), kontrol positif (II), kontrol negatif (III), dan pemberian PSK sebelum infeksi TB (IV). Menurut Meira (1996), adanya  $\beta$ -glukan dapat meningkatkan respon imun dengan menstimulasi fungsinya meningkatkan fagositosis terhadap antigen. Di Renzo *et al.* (1991), ekstrak jamur *C. versicolor* mengandung polisakarida krestin yang dapat menstimulasi respon

imun, menstimulasi fungsi *antigen-presenting cells* (APC) makrofag dan menstimulasi fungsi imun lainnya.

### 5.3. Pengamatan kondisi respon imun spesifik (titer Ab, macam Ig, IFN gamma)

#### 5.3.1. Pembentukan antibodi

Antibodi adalah protein imunoglobulin yang disekresi oleh sel B yang teraktifasi oleh antigen. Menurut Junqueira *et al.* (1997), antibodi bekerja melalui 2 cara untuk mempertahankan tubuh terhadap agen penyakit, yaitu secara langsung menyerang agen penyakit (aglutinasi, presipitasi, netralisasi, dan lisis) dan mengaktifkan sistem komplemen.

Indikator pembentukan antibodi yang diukur dengan menggunakan ELISA *reader* berupa nilai *optical density* (OD). Kirkegaard & Perry Laboratories tahun 2008, nilai OD merupakan nilai yang didapat dari reaksi antigen-antibodi yang ditandai oleh perubahan warna dari semula tidak berwarna menjadi berwarna hijau karena substrat yang digunakan dalam uji ELISA adalah 2,2"-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). Nilai OD dari antibodi dapat di lihat pada Tabel 5.11.

Nilai OD dari interaksi antigen dan antibodi pada kontrol (I) berbeda tidak nyata dengan kontrol positif (II), tetapi berbeda nyata dengan kontrol negatif (III), dan pemberian PSK (IV, V, VI). Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya antigen bakteri TB dan pemberian PSK meningkatkan produksi antibodi. Tetapi PSK yang diberikan tanpa ada infeksi bakteri tidak dapat menstimulasi produksi antibodi. Menurut Abbas *et al.* (2000), antibodi dibentuk sebagai reaksi imun terhadap substansi atau antigen yang masuk dalam tubuh. Produksi antibodi tertinggi pada pemberian PSK sebelum dan sesudah

infeksi *M. tuberculosis*. Menurut Gotoh *et al.* (1991), polisakarida krestin (PSK) dapat meningkatkan proliferasi limfosit B secara *in-vitro*.

Tabel 5.11. Antibodi yang ditunjukkan dengan nilai OD

| Replikasi | Nilai OD dari antibodi ( $\text{\AA}$ ) pada kelompok perlakuan |          |          |          |          |          |
|-----------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
|           | I   | II       | III      | IV       | V        | VI       |
| 1         | 0.663   | 0.682    | 1.135    | 1.058    | 1.190    | 1.154    |
| 2         | 0.595   | 0.611    | 1.047    | 1.089    | 1.109    | 1.212    |
| 3         | 0.570   | 0.645    | 1.040    | 0.811    | 1.142    | 1.247    |
| 4         | 0.572   | 0.636    | 1.005    | 1.107    | 1.109    | 1.391    |
| 5         | 0.558   | 0.634    | 0.997    | 1.101    | 1.085    | 1.154    |
| Rata-rata | 0.5916 a  | 0.6416 a | 1.0448 b | 1.0332 b | 1.1270 b | 1.2316 c |
| SD        | 0.04210   | 0.02583  | 0.05485  | 0.12564  | 0.04064  | 0.09756  |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan



Gambar 5.3. Hasil ELISA dalam pengukuran antibodi

### 5.3.2 Macam imunoglobulin

Antibodi digolongkan menjadi 5 kelas yang berbeda, yaitu IgA, IgM, IgG, IgD, dan IgE. Struktur dan fungsi masing-masing kelas berbeda satu sama lain (Abbas *et al.*, 2000). Macam imunoglobulin dapat di lihat pada Tabel 5.12.

Tabel 5.12. Macam imunoglobulin (Ig)

| Macam Ig | Nilai OD dari macam Ig (Å) pada kelompok perlakuan |       |       |       |       |       |
|----------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
|          | I  | II    | III   | IV    | V     | VI    |
| IgG1     | 0,863  | 0,881 | 1,101 | 1,201 | 1,131 | 0,165 |
| IgG2a    | 0,869  | 0,932 | 1,378 | 1,475 | 1,349 | 0,345 |
| IgG2b    | 0,875  | 0,935 | 1,379 | 1,542 | 1,460 | 1,476 |
| IgG3     | 0,831  | 0,951 | 1,496 | 1,551 | 1,523 | 1,499 |
| IgA      | 0,852  | 0,843 | 1,061 | 1,184 | 1,181 | 1,102 |
| IgM      | 0,939  | 0,990 | 1,304 | 1,394 | 1,288 | 1,309 |
| Kappa    | 0,861  | 0,890 | 1,290 | 1,302 | 1,327 | 1,298 |
| Lambda   | 0,823  | 0,921 | 1,201 | 1,222 | 1,210 | 1,206 |

Pada kontrol (I) dan kontrol positif (III), macam Ig relatif sama karena antibodi belum begitu diproduksi. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif (II), kelompok IV, V, dan VI didominasi dengan kelas IgG. Menurut Weir (1990) dan Frank (1995), IgG merupakan Ig utama dalam serum, sekitar 75% dari seluruh Ig. Bentuk monomer dengan BM 150 kDa.. IgG pada mencit terbagi atas IgG1, IgG2a, IgG2b, dan IgG3.

Subkelas IgG3 lebih mendominasi dibandingkan subkelas IgG lain. Hal tersebut sesuai dengan fungsinya, yaitu IgG3 untuk pengenalan terhadap epitop karbohidrat. Pada penelitian ini, bahan imunomodulatornya adalah PSK yang mempunyai bahan aktif karbohidrat  $\beta$ -glukan. Subkelas IgG2a dan IgG2a juga relatif tinggi dan nilai OD terkecil adalah IgG1. Menurut Scott *et al.* (1990), Ig G2a dan Ig G2b pada mencit mempunyai kemampuan melekatkan diri pada komplemen dan antigen protein. Ig G1 berguna untuk perlekatan dengan *mast cell*, sedangkan Ig G3 untuk pengenalan epitop karbohidrat.

Nilai OD dari IgM lebih rendah sedikit daripada nilai OD dari IgG. Menurut Goldsby *et al.* (2000), IgM mempunyai BM terbesar, yaitu 900 kDa. dan bentuknya pentamer. Tempat pengikatan yang banyak sangat efektif dalam mengaglutinasi antigen. IgM terbentuk sebelum IgG

Nilai IgA paling reandah dibandingkan dengan subkelas Ig lainnya. Menurut Goldsby *et al.* (2000), IgA banyak ditemukan pada sekresi mukosa, berfungsi sebagai pertahanan dini terhadap perlekatan virus dan bakteri patogen pada membran mukosa tubuh. IgA mempunyai BM 170 kDa.

IgE dan IgD tidak diukur nilai OD karena kedua imunoglobulin tersebut sedikit dalam serum. Menurut Goldsby *et al.* (2000) dan Campbell *et al.* (2004), IgE dan IgD pada serum dalam konsentrasi rendah. IgE mempunyai BM 200 kDa, bentuk monomer, berperan dalam reaksi hipersensitivitas. IgD mempunyai BM 180 kDa, bentuk monomer, berfungsi dalam diferensiasi limfosit B menjadi sel plasma.

Ada 2 jenis rantai ringan (*kappa* dan *lambda*) yang terdiri atas 230 asam amino. Berdasarkan hasil penelitian antara rantai ringan *kappa* dan *lamda* mempunyai nilai yang sebanding. Akibat infeksi TB dan pemberian PSK, nilai OD ke-2 jenis rantai ringan tersebut lebih tinggi.

### 5.3.3. IFN-gamma (IFN- $\gamma$ )

Interferon merupakan sekelompok sitokin yang berfungsi sebagai pembawa berita antar sel. Interferon dilepaskan berbagai macam sel bila distimulasi oleh berbagai macam penyebab seperti polinukleotida, beberapa sitokin lain serta ekstrak virus, jamur dan bakteri. Berdasarkan sifatnya terhadap antigen, IFN- $\gamma$  terbagi menjadi 3 tipe utama yaitu  $\alpha$  (diproduksi leukosit),  $\beta$  (diproduksi fibroblas) dan  $\gamma$  (diproduksi limfosit T). Meskipun

banyak sitokin yang terlibat pada respons terhadap TB, IFN- $\gamma$  memainkan peran kunci dalam meningkatkan efek limfosit T terhadap makrofag alveolar. Nilai OD dari pengukuran IFN- $\gamma$  dapat di lihat pada Tabel 5.13.

Tabel 5.13. Nilai OD dari pengukuran IFN- $\gamma$

| Replikasi | Nilai OD dari IFN- $\gamma$ (Å) pada kelompok perlakuan |          |          |          |          |          |
|-----------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
|           | I   | II       | III      | IV       | V        | VI       |
| 1         | 0.563   | 0.654    | 1.097    | 1.158    | 1.190    | 1.254    |
| 2         | 0.555   | 0.610    | 1.068    | 1.189    | 1.189    | 1.212    |
| 3         | 0.570   | 0.644    | 1.078    | 1.090    | 1.182    | 1.227    |
| 4         | 0.572   | 0.648    | 1.111    | 1.007    | 1.179    | 1.291    |
| 5         | 0.568   | 0.656    | 1.102    | 1.001    | 1.185    | 1.254    |
| Rata-rata | 0.5656 a  | 0.6424 b | 1.0912 c | 1.0890 c | 1.1850 d | 1.2476 e |
| SD        | 0.00680   | 0.01873  | 0.01771  | 0.08548  | 0.00464  | 0.03024  |

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  pada uji Duncan

Berdasarkan hasil pengukuran IFN- $\gamma$  terlihat bahwa kelompok kontrol (I) paling kecil nilai OD dan berbeda nyata dengan kelompok III, IV, V, dan VI. Nilai OD kelompok II berbeda nyata dengan kelompok III, IV, V, dan VI. Nilai OD IFN- $\gamma$  kelompok III berbeda tidak nyata dengan kelompok IV, tetapi berbeda nyata dengan kelompok V dan VI. Nilai OD IFN- $\gamma$  pada kelompok VI paling tinggi diikuti dengan kelompok V. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian PSK sesudah dan sebelum dan sesudah infeksi *M. tuberculosis* dapat meningkatkan produksi IFN- $\gamma$ . Menurut Tzianabos (2000), PSK dalam ekstrak jamur *Coriolus versicolor* berpotensi sebagai imunostimulator dengan aktivitas spesifik untuk sel T dan *antigen-presenting cells* (APC) seperti monosit dan makrofag. Aktivitas spesifik dicirikan oleh kemampuannya meningkatkan jumlah sel darah putih, peningkatan produksi IFN- $\gamma$  dan IL-2, dan peningkatan *delayed type hypersensitivity reactions*. Sejumlah laporan menyatakan bahwa PSK mampu mengaktifkan komponen seluler dan humoral dari sistem imun.

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. PSK mampu memperbaiki kondisi sel-sel imunokompeten terutama pada peningkatan jumlah total leukosit, jumlah makrofag dan gambaran histologis derivat-derivat leukosit pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*.
2. PSK mampu mengembalikan dan memperkuat fungsi respon imun non-spesifik melalui uji fungsi fagositosis sel-sel makrofag secara *in vivo* pada mencit akibat infeksi *M. Tuberculosis* terutama pada pemberian sebelum dan sesudah infeksi.
3. PSK dapat mengembalikan dan memperkuat respon imun spesifik melalui pengukuran pengukuran kadar IFN- $\gamma$ , titer antibodi dan analisis isotype imunoglobulin dengan teknik ELISA pada mencit akibat infeksi *M. tuberculosis*

### 6.2. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa PSK dapat memberikan daya tahan pada tubuh hewan coba mencit sehingga dapat mengembalikan dan memperkuat akibat infeksi TB paru karena *M. tuberculosis*. Pemberian PSK sebelum dan sesudah infeksi TB lebih disarankan untuk menstimulasi respon imun.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. 2000. *Cellular and molecular immunology*. WB. Saunders Company.
- Anonimus, 2000, Pedoman pelaksanaan uji klinik obat tradisional, 1, 5, 14-15, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonimus, 2004. About *Coriolus*. JHS Natural Products, <http://www.jhsnp.com/store/howdoes.html>
- Arjun, K.S dan Ramesh, P.S., 1982. A textbook of botany : Thallophyta (Algae, Fungi, Bacteria, Virus and Lichen), vol. 1 ed. Rev ke-8 Delhi : Ratan Prakasan Mandir, Educational and University Publishar: 191.
- Asai K, Kato H, Hirose K, Akaogi K, Kimura S, Mukai S, Inouye M, Yamamura Y, Sano H, Sugino S, Yoshikawa T, dan Kondo M., 2000. PSK and 432-induced immunomodulation of inducible nitric oxide (NO) synthase gene expression in mouse peritoneal polymorphonuclear leucocytes and NO-mediated cytotoxicity. *Immunopharmacology Immunotoxicology*, 22 : 221-235.
- Baratawidjaja, K.G. 1996. *Imunologi dasar*. Penerbit Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Campbell, N. A., B. R. Jane, and G. M. Lawrence. 2004. *Biologi*, edisi kelima, jilid III. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Cheng, K-F., P-C. Leung. 2008. General review of polysaccharopeptides (PSP) from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies. *Cancer Therapy*, 6: 117-130.
- Cui, J. dan Chisti, Y. 2003. Polisaccharopeptides of *Cariolus versicolor*: physiological activity, uses. and production. *Biotechnol Adv.*, 2003. Hal 109-122.
- Cui, J., K.K.T. Goh, R. Archer dan H. Singh. 2007. Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wt-74 and ATCC-20545 strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34:393-402.
- Di Renzo, L., Yefenof, E., dan Klein, E. 1991. The function of human NK cells is enhanced by  $\beta$ -glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *Eur. J. Immunol*, 1991, 21: 1755-1758.
- Effendi, Z. 2003. *Daya fagositosis makrofag padajaringan longgar tubuh*. Bagian Hitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara.

- Fisher, M. dan Yang Li-Xi. 2002. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): Implications of cancer immunotherapy. *Anticancer research*, vol. 22, no. 3, pp. 1737-1754.
- Frank, C.L. 1995. *Toksikologi Dasar, Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko*, edisi ke dua. Penerjemah Edi Nugroho. Indonesia University Press. Jakarta.
- Gartner, L.P. dan Hiatt, J.L. 2000. *Color Atlas of Histology* 3<sup>th</sup> edition. University of Maryland. Maryland.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, and B. A. Osborne. 2000. *Kuby Immunology*. 4<sup>th</sup> Edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- Gotoh, K., Gouchi, A., Akura, Y., Tanaka, N., dan Orita, K. 1991. Augmentation of cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes by biological response modifiers. *Int. J. Immunopharmac*, 1991, 5: 485-492.
- Jin, T.Y. 1999. Toxicological research on Yun Zhi polysaccharopeptide (PSP). In: Yan, Q. T. International Symposium on Traditional Chinese Medicine and Cancer: Development and Clinical Validation—Advances Research in PSP. Hong Kong Association for Health Care Ltd. pp. 76-9.
- Junqueira, L.C., Carniero, J., dan Kelley, R.O. 1997. *Histologi dasar*. EGC, Jakarta.
- Kagohashi, Y., Naora, H., and Otani, H. 2002. PSK, a biological response modifier, modifier p53 expression, mitosis, and apoptosis in X-ray irradiated mouse embryos: Possible cellular mechanism of anti-teratogenic effect. *Congenital Anomalies*, 2002, 42: 15-20.
- Karuniawati, A., Risdiyani, E., Nilawati, S., Prawoto, Rosana, Y., Alisyahbana, B., Parwati, I., Wia Melia, dan Sudiro, T.M. 2005. Perbandingan Tan Thiam Hok, Ziehl Neelsen dan fluorokrom sebagai metode pewarnaan basil tahan asam untuk pemeriksaan mikroskopik sputum. *Makara, Kesehatan*, 9 (1), JUNI 2005: 29-33.
- Kidd, P.M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev*, 2000, 5: 4-27
- Meira, D.A., et al., 1996. The Use of glucan as immunostimulant in the treatment of Paracoccidioidomycosis. *Departement of Microbiology, State of Sao Paulo, Brazil*. 55 (5), 496-503.
- Nasir, M. 1999. *Metode Penelitian*, edisi 4. Ghalia Indonesia, Jakarta.
- Pang, Z. 2003. Effect of polisaccharide krestin on the up-regulation of macrofage colony-stimulating factor gene expression in protecting mouse peritoneal macrophages from oxidative injury. *American J. of Chinese Med*.

- Pedrinaci, S., I. Algara, dan F. Garrido. 1999. Protein bound polysaccharide (PSK) induces cytotoxic activity in the NKL human natural killer cell line. *Int. J. Clin Lab. Res.* 1999, 29: 135-140.
- Rau, U., Kuenz, A., Wray, V., Nimtz, M., Wrenger, J., dan Cicek, H. 2009. Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81:827–837.
- Roitt, V., Brostoff, J., dan Male, D. 1993. *Immunology*, 3<sup>rd</sup> ed. Mosby-Year Book Europe Ltd., London.
- Safitri E. 2000. Studi Tentang Efek Imunostimulan Tilosin Terhadap Peningkatan Respon Kekebalan Nonspesifik [Skripsi]. Jakarta: *Fakultas Farmasi Universitas Pancasila*.
- Steinberg, P. 1977. PSK-*Coriolus versicolor* and cancer. *Wildfire Natural Products*.
- Subagyo, A; Aditama, T.J.; Sutoyo, D.K.; dan Lia G Partakusuma, L.G., 2006. Pemeriksaan interferon-gamma dalam darah untuk deteksi infeksi tuberkulosis. *Jurnal Tuberkulosis Indonesia*, 3(2): 6-19.
- Sulaksono, M.E. 1994. Penentuan nilai rujukan faal hewan percobaan sebagai model penyakit manusia dan hewan. *Research Report from JKPKBPPK/2002-12-23*.
- Taylor, P.R., Brown, G.D., Reid, D.M., Willment, J.A., Pomares, L.M., Gordon, S., Wong Y.C.S., 2002. The  $\beta$ -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of the monocyte/ macrophage and neutrophil lineages. *The Journal of Immunology*. 169 : 3876-3882.
- Tsakagoshi S., Hashimoto Y., Fujii G., Kobayashi H., Nomoto K., dan Orita K. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treatment Review*, 11 : 75 - 86
- Tzinabos, A. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspect and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13: 523-533.
- Wahyuningsih, S.P.A. 2006. *Pemanfaatan ekstrak jamur *Coriolus versicolor* sebagai imunomodulator respon imun non-spesifik pada tikus putih akibat infeksi *M. tuberculosis**. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Weir, D.R. 1990. *Segi Praktis Immunologi*. Alih Bahasa: Yulius E.S. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Yang, M.M.P., Chen, Z., Kwok, J.S.L., 1993. The Antitumor Effect of A Small Polypeptide from *Coriolus versicolor* (SPCV). *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventif*. 4 : 275-281.

**LAMPIRAN 1. Penentuan kadar karbohidrat dan kurva baku**

**PHENOL SULPHURIC ACID CARBOHYDRATE ASSAY (REFERENCE: Anal. Chem. 28:(1956) 350-356)**

**TUJUAN:** Untuk mendeteksi keberadaan gula

**BAHAN:**

- Standart : *glucose* 1 mg / ml larutan stok
- Larutan *glucose* sebanyak 10, 20, 40, 60, 80 µl dan ditambahkan dengan dH<sub>2</sub>O sampai volume akhir 100 µl.
- Blanko 100 µl air dH<sub>2</sub>O
- Larutan sampel: 50 µl sampel (ekstrak jamur *C. versicolor*) ditambah dH<sub>2</sub>O sampai volume akhir 100 µl.

**METODE:**

1. Masing-masing larutan standart, blanko, dan larutan sampel ditambahkan 50 ul 80% larutan Phenol (80% Phenol by weight).
2. Masing-masing divorteks dan ditambahkan 2,0 ml Sulphuric Acid melalui dinding tabung.
3. Selanjutnya didiamkan dalam keadaan berdiri selama 10 menit. pada suhu kamar.
4. Baca dalam Absorbansi 490 nm.

| No | Volume sampel (µl) | Nilai OD (Å) |
|----|--------------------|--------------|
| 1  | 10                 | 0,0441       |
| 2  | 20                 | 0,1334       |
| 3  | 40                 | 0,4651       |
| 4  | 60                 | 0,5311       |
| 5  | 80                 | 0,6183       |

**Model Summary and Parameter Estimates**

Dependent Variable:OD

| Equation | Model Summary |        |     |     |      | Parameter Estimates |      |
|----------|---------------|--------|-----|-----|------|---------------------|------|
|          | R Square      | F      | df1 | df2 | Sig. | Constant            | b1   |
| Linear   | .911          | 30.819 | 1   | 3   | .012 | .003                | .008 |

The independent variable is Vouolume Glukose.

Persamaan regresi yang didapatkan adalah :

$$Y = b_1 X + b_0 \quad \text{sehingga} \quad Y = 0,008 X + 0,003$$

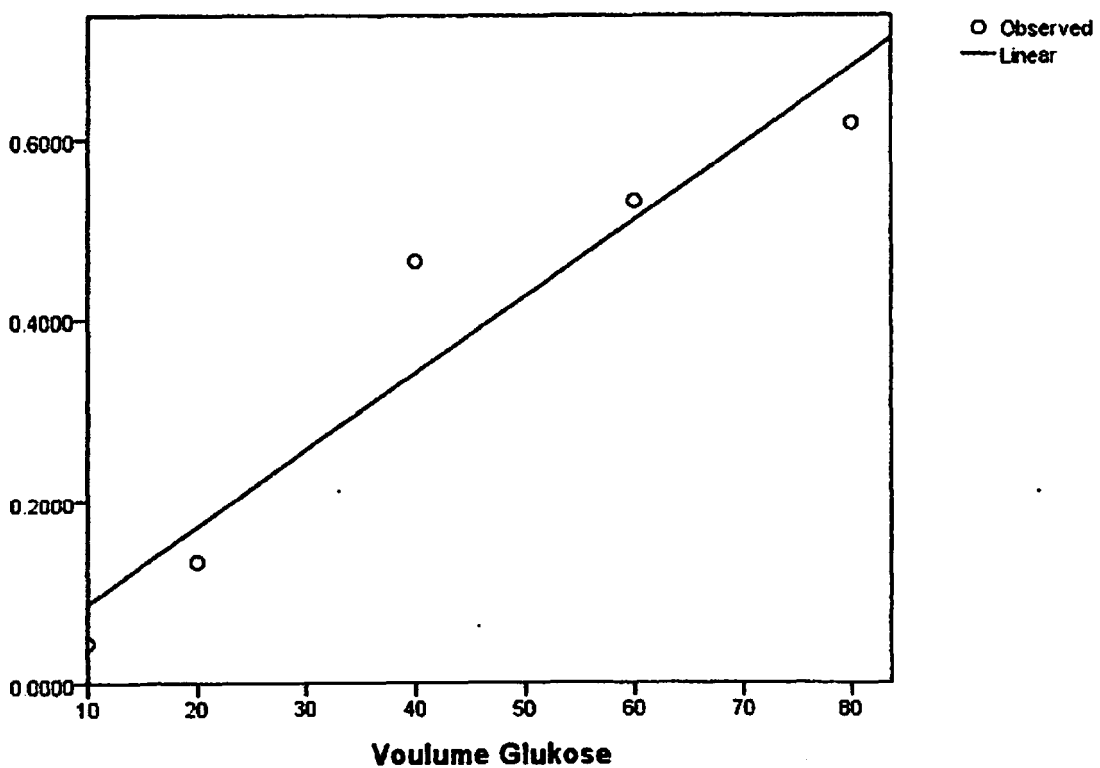
X = Konsentrasi glukosa

Y = Nilai OD

$$X = \frac{Y - 0,003}{0,008} \quad \text{karena volume sampel yang diukur } 50 \mu\text{l, maka}$$

$$\text{Konsentrasi Glukosa} = \frac{X}{50} \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

OD



## LAMPIRAN 2. Optimasi konsentrasi amonium sulfat

Berat ekstrak *C. versicolor* yang digunakan untuk diendapkan dalam ammonium sulfat sebesar 0,01 g

| No | Berat Ammonium Sulfat per 1 ml (g) | Konsentrasi Ammonium Sulfat (%) | Nilai OD (Å) | Konsentrasi glukosa (µg/µl) |
|----|------------------------------------|---------------------------------|--------------|-----------------------------|
| 1  | 0,176                              | 30                              | 0,9479       | 2,3648                      |
| 2  | 0,242                              | 40                              | 1,0343       | 2,5808                      |
| 3  | 0,314                              | 50                              | 1,2323       | 3,0758                      |
| 4  | 0,390                              | 60                              | 1,5513       | 3,8733                      |
| 5  | 0,472                              | 70                              | 2,0331       | 5,0778                      |
| 6  | 0,561                              | 80                              | 2,2601       | 5,6453                      |
| 7  | 0,657                              | 90                              | 3,0108       | 7,5208                      |

Konsentrasi ammonium sulfat yang optimum untuk pengendapan protein krestin pada konsentrasi 90 %. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai OD dan konsentrasi glukosa yang tinggi.

### LAMPIRAN 3. Analisis data berat limpa

#### Means

##### Case Processing Summary

|                            | Cases    |         |          |         |       |         |
|----------------------------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|                            | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|                            | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Berat Limpa * Perlakuan ke | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

#### Report

##### Berat Limpa

| Perlakuan ke | N  | Mean    | Std. Deviation |
|--------------|----|---------|----------------|
| 1            | 5  | .274380 | .0329237       |
| 2            | 5  | .276620 | .0427543       |
| 3            | 5  | .301660 | .0696880       |
| 4            | 5  | .282440 | .0382020       |
| 5            | 5  | .278700 | .0169591       |
| 6            | 5  | .275860 | .0453842       |
| Total        | 30 | .281610 | .0410665       |

#### NPar Tests

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                |                | Berat Limpa |
|--------------------------------|----------------|-------------|
| N                              |                | 30          |
| Normal Parameters <sup>a</sup> | Mean           | .281610     |
|                                | Std. Deviation | .0410665    |
| Most Extreme Differences       | Absolute       | .090        |
|                                | Positive       | .087        |
|                                | Negative       | -.090       |
| Kolmogorov-Smirnov Z           |                | .494        |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         |                | .968        |

a. Test distribution is Normal.

#### Oneway

##### Test of Homogeneity of Variances

##### Berat Limpa

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.327            | 5   | 24  | .286 |

##### ANOVA

##### Berat Limpa

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F    | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Between Groups | .003           | 5  | .001        | .270 | .925 |
| Within Groups  | .046           | 24 | .002        |      |      |
| Total          | .049           | 29 |             |      |      |

## LAMPIRAN 4. Analisis data jumlah leukosit

### Means

#### Case Processing Summary

|                                      | Cases    |         |          |         |       |         |
|--------------------------------------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|                                      | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|                                      | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Jumlah total leukosit *<br>Perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

#### Report

#### Jumlah total leukosit

| Perlakuan | Mean     | N  | Std. Deviation |
|-----------|----------|----|----------------|
| 1         | 6.0700E3 | 5  | 555.80778      |
| 2         | 5.9020E3 | 5  | 614.22309      |
| 3         | 1.2660E4 | 5  | 2113.68162     |
| 4         | 1.0226E4 | 5  | 706.18163      |
| 5         | 7.6820E3 | 5  | 615.15852      |
| 6         | 9.4580E3 | 5  | 352.37764      |
| Total     | 8.6663E3 | 30 | 2602.51832     |

### NPar Tests

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                 |                | Jumlah total leukosit |
|---------------------------------|----------------|-----------------------|
| N                               |                | 30                    |
| Normal Parameters <sup>a</sup>  | Mean           | 8666.3333             |
|                                 | Std. Deviation | 2602.51832            |
| Most Extreme Differences        | Absolute       | .142                  |
|                                 | Positive       | .142                  |
|                                 | Negative       | -.082                 |
| Kolmogorov-Smirnov Z            |                | .776                  |
| Asymp. Sig. (2-tailed)          |                | .583                  |
| a. Test distribution is Normal. |                |                       |

#### Test of Homogeneity of Variances

#### Jumlah total leukosit

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 4.527            | 5   | 24  | .005 |

### Oneway

#### Robust Tests of Equality of Means

#### Jumlah total leukosit

|                | Statistic <sup>a</sup> | df1 | df2   | Sig. |
|----------------|------------------------|-----|-------|------|
| Brown-Forsythe | 33.495                 | 5   | 7.354 | .000 |

a. Asymptotically F distributed.



## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Jumlah total leukosit  
Games-Howell

| (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|---------------|---------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|               |               |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1             | 2             | 168.00000             | 3.70397E2  | .997 | -1188.7758              | 1524.7758   |
|               | 3             | -6590.00000           | 9.77379E2  | .010 | -10936.5462             | -2243.4538  |
|               | 4             | -4156.00000           | 4.01844E2  | .000 | -5645.0866              | -2666.9134  |
|               | 5             | -1612.00000           | 3.70707E2  | .021 | -2970.0175              | -253.9825   |
|               | 6             | -3388.00000           | 2.94235E2  | .000 | -4514.1534              | -2261.8466  |
| 2             | 1             | -168.00000            | 3.70397E2  | .997 | -1524.7758              | 1188.7758   |
|               | 3             | -6758.00000           | 9.84370E2  | .009 | -11083.5181             | -2432.4819  |
|               | 4             | -4324.00000           | 4.18560E2  | .000 | -5860.8022              | -2787.1978  |
|               | 5             | -1780.00000           | 3.88765E2  | .015 | -3200.4415              | -359.5585   |
|               | 6             | -3556.00000           | 3.16683E2  | .000 | -4791.0509              | -2320.9491  |
| 3             | 1             | 6590.00000            | 9.77379E2  | .010 | 2243.4538               | 10936.5462  |
|               | 2             | 6758.00000            | 9.84370E2  | .009 | 2432.4819               | 11083.5181  |
|               | 4             | 2434.00000            | 9.96629E2  | .295 | -1860.8654              | 6728.8654   |
|               | 5             | 4978.00000            | 9.84487E2  | .029 | 652.8105                | 9303.1895   |
|               | 6             | 3202.00000            | 9.58313E2  | .139 | -1216.7886              | 7620.7886   |
| 4             | 1             | 4156.00000            | 4.01844E2  | .000 | 2666.9134               | 5645.0866   |
|               | 2             | 4324.00000            | 4.18560E2  | .000 | 2787.1978               | 5860.8022   |
|               | 3             | -2434.00000           | 9.96629E2  | .295 | -6728.8654              | 1860.8654   |
|               | 5             | 2544.00000            | 4.18835E2  | .003 | 1006.3505               | 4081.6495   |
|               | 6             | 768.00000             | 3.52948E2  | .365 | -646.9749               | 2182.9749   |
| 5             | 1             | 1612.00000            | 3.70707E2  | .021 | 253.9825                | 2970.0175   |
|               | 2             | 1780.00000            | 3.88765E2  | .015 | 359.5585                | 3200.4415   |
|               | 3             | -4978.00000           | 9.84487E2  | .029 | -9303.1895              | -652.8105   |
|               | 4             | -2544.00000           | 4.18835E2  | .003 | -4081.6495              | -1006.3505  |
|               | 6             | -1776.00000           | 3.17046E2  | .009 | -3012.8312              | -539.1688   |
| 6             | 1             | 3388.00000            | 2.94235E2  | .000 | 2261.8466               | 4514.1534   |
|               | 2             | 3556.00000            | 3.16683E2  | .000 | 2320.9491               | 4791.0509   |
|               | 3             | -3202.00000           | 9.58313E2  | .139 | -7620.7886              | 1216.7886   |
|               | 4             | -768.00000            | 3.52948E2  | .365 | -2182.9749              | 646.9749    |
|               | 5             | 1776.00000            | 3.17046E2  | .009 | 539.1688                | 3012.8312   |

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## LAMPIRAN 4. Analisis data jumlah total makrofag

### Means

Case Processing Summary

|   | Cases    |         |          |         |       |         |
|---|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|   | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|   | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Jumlah total makrofag *<br>Kelompok perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

### Report

Jumlah total makrofag

| Kelompok perlakuan | Mean      | N  | Std. Deviation |
|--------------------|-----------|----|----------------|
| 1                  | 2.74620E4 | 5  | 1553.872582    |
| 2                  | 1.94700E4 | 5  | 2144.134441    |
| 3                  | 6.81540E4 | 5  | 1.091863E4     |
| 4                  | 7.32150E4 | 5  | 7838.020318    |
| 5                  | 3.32460E4 | 5  | 1810.394985    |
| 6                  | 4.04820E4 | 5  | 5537.605078    |
| Total              | 4.36715E4 | 30 | 2.124090E4     |

### NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smimov Test

|                                |                | Jumlah total makrofag |
|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| N                              |                | 30                    |
| Normal Parameters <sup>a</sup> | Mean           | 43671.50000           |
|                                | Std. Deviation | 2.124090E4            |
| Most Extreme Differences       | Absolute       | .212                  |
|                                | Positive       | .212                  |
|                                | Negative       | -.101                 |
| Kolmogorov-Smirnov Z           |                | 1.159                 |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         |                | .136                  |

a. Test distribution is Normal.

### Oneway

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah total makrofag

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 5.652            | 5   | 24  | .001 |

### Robust Tests of Equality of Means

Jumlah total makrofag

|                | Statistic <sup>a</sup> | df1 | df2    | Sig. |
|----------------|------------------------|-----|--------|------|
| Brown-Forsythe | 66.051                 | 5   | 10.358 | .000 |

a. Asymptotically F distributed.

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

Jumlah total makrofag

Games-Howell

| (I) Kelompok perlakuan | (J) Kelompok perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|------------------------|------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                        |                        |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1                      | 2                      | 7992.000000           | 1.184216E3 | .002 | 3556.94047              | 12427.05953 |
|                        | 3                      | -4.069200E4           | 4.932159E3 | .006 | -6.36007E4              | -1.77833E4  |
|                        | 4                      | -4.575300E4           | 3.573488E3 | .001 | -6.20550E4              | -2.94510E4  |
|                        | 5                      | -5.784000E3           | 1.066963E3 | .006 | -9705.27127             | -1862.72873 |
|                        | 6                      | -1.302000E4           | 2.572143E3 | .030 | -2.43720E4              | -1668.02459 |
| 2                      | 1                      | -7.992000E3           | 1.184216E3 | .002 | -1.24271E4              | -3556.94047 |
|                        | 3                      | -4.868400E4           | 4.976218E3 | .003 | -7.14004E4              | -2.59676E4  |
|                        | 4                      | -5.374500E4           | 3.634058E3 | .000 | -6.98326E4              | -3.76574E4  |
|                        | 5                      | -1.377600E4           | 1.254977E3 | .000 | -1.83943E4              | -9157.74722 |
|                        | 6                      | -2.101200E4           | 2.655650E3 | .003 | -3.21832E4              | -9840.75406 |
| 3                      | 1                      | 4.069200E4            | 4.932159E3 | .006 | 17783.33869             | 63600.66131 |
|                        | 2                      | 4.868400E4            | 4.976218E3 | .003 | 25967.62259             | 71400.37741 |
|                        | 4                      | -5061.000000          | 6.010840E3 | .950 | -2.76036E4              | 17481.55558 |
|                        | 5                      | 3.490800E4            | 4.949625E3 | .011 | 12078.69855             | 57737.30145 |
|                        | 6                      | 2.767200E4            | 5.475062E3 | .017 | 5793.29165              | 49550.70835 |
| 4                      | 1                      | 4.575300E4            | 3.573488E3 | .001 | 29451.03920             | 62054.96080 |
|                        | 2                      | 5.374500E4            | 3.634058E3 | .000 | 37657.38942             | 69832.61058 |
|                        | 3                      | 5061.000000           | 6.010840E3 | .950 | -1.74816E4              | 27603.55558 |
|                        | 5                      | 3.996900E4            | 3.597557E3 | .001 | 23759.46269             | 56178.53731 |
|                        | 6                      | 3.273300E4            | 4.291844E3 | .001 | 16598.85920             | 48867.14080 |
| 5                      | 1                      | 5784.000000           | 1.066963E3 | .006 | 1862.72873              | 9705.27127  |
|                        | 2                      | 1.377600E4            | 1.254977E3 | .000 | 9157.74722              | 18394.25278 |
|                        | 3                      | -3.490800E4           | 4.949625E3 | .011 | -5.77373E4              | -1.20787E4  |
|                        | 4                      | -3.996900E4           | 3.597557E3 | .001 | -5.61785E4              | -2.37595E4  |
|                        | 6                      | -7236.000000          | 2.605479E3 | .213 | -1.85006E4              | 4028.58879  |
| 6                      | 1                      | 1.302000E4            | 2.572143E3 | .030 | 1668.02459              | 24371.97541 |
|                        | 2                      | 2.101200E4            | 2.655650E3 | .003 | 9840.75406              | 32183.24594 |
|                        | 3                      | -2.767200E4           | 5.475062E3 | .017 | -4.95507E4              | -5793.29165 |
|                        | 4                      | -3.273300E4           | 4.291844E3 | .001 | -4.88671E4              | -1.65989E4  |
|                        | 5                      | 7236.000000           | 2.605479E3 | .213 | -4028.58879             | 18500.58879 |

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## LAMPIRAN 5. Analisis data histologis derivat-derivat leukosit

### 5.1. Persentase Limfosit

#### Means

Case Processing Summary

|   | Cases    |         |          |         |       |         |
|---|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|   | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|   | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Presentase Limfosit *<br>Kelompok Perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

#### Report

##### Presentase Limfosit

| Kelompok Perlakuan | Mean   | N  | Std. Deviation |
|--------------------|--------|----|----------------|
| 1                  | 34.640 | 5  | 3.1134         |
| 2                  | 60.300 | 5  | 4.7932         |
| 3                  | 85.180 | 5  | 1.1256         |
| 4                  | 70.840 | 5  | 2.1220         |
| 5                  | 79.160 | 5  | 2.9771         |
| 6                  | 74.900 | 5  | 2.4280         |
| Total              | 67.503 | 30 | 17.0629        |

#### NPar Tests

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                |                          | Presentase Limfosit |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------|
| N                              |                          | 30                  |
| Normal Parameters <sup>a</sup> | Mean                     | 67.503              |
|                                | Std. Deviation           | 17.0629             |
|                                | Most Extreme Differences |                     |
|                                | Absolute                 | .185                |
|                                | Positive                 | .138                |
|                                | Negative                 | -.185               |
| Kolmogorov-Smirnov Z           |                          | 1.015               |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         |                          | .254                |

a. Test distribution is Normal.

##### Test of Homogeneity of Variances

##### Presentase Limfosit

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.289            | 5   | 24  | .301 |

## Oneway

### ANOVA

#### Presentase Limfosit

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 8230.366       | 5  | 1646.073    | 185.681 | .000 |
| Within Groups  | 212.784        | 24 | 8.866       |         |      |
| Total          | 8443.150       | 29 |             |         |      |

## Post Hoc Tests (Homogeneous Subsets)

### Presentase Limfosit

#### Duncan

| Kelompok Perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |        |        |        |
|--------------------|---|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                    |   | 1                       | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      |
| 1                  | 5 | 34.640                  |        |        |        |        |        |
| 2                  | 5 |                         | 60.300 |        |        |        |        |
| 4                  | 5 |                         |        | 70.840 |        |        |        |
| 6                  | 5 |                         |        |        | 74.900 |        |        |
| 5                  | 5 |                         |        |        |        | 79.160 |        |
| 3                  | 5 |                         |        |        |        |        | 85.180 |
| Sig.               |   | 1.000                   | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## 5.2. Persentase Monosit

### Means

#### Case Processing Summary

|  | Cases    |         |          |         |       |         |
|--|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|  | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|  | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Persentase Monosit *<br>Kelompok Perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

### Report

#### Persentase Monosit

| Kelompok Perlakuan | Mean   | N  | Std. Deviation |
|--------------------|--------|----|----------------|
| 1                  | 19.500 | 5  | 2.5524         |
| 2                  | 16.520 | 5  | 1.3293         |
| 3                  | 5.780  | 5  | .8927          |
| 4                  | 8.360  | 5  | 1.2012         |
| 5                  | 5.400  | 5  | .9247          |
| 6                  | 7.280  | 5  | 1.3442         |
| Total              | 10.473 | 30 | 5.7389         |

## NPar Tests

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                 |                | Persentase Monosit |
|---------------------------------|----------------|--------------------|
| N                               |                | 30                 |
| Normal Parameters <sup>a</sup>  | Mean           | 10.473             |
|                                 | Std. Deviation | 5.7389             |
| Most Extreme Differences        | Absolute       | .248               |
|                                 | Positive       | .248               |
|                                 | Negative       | -.152              |
| Kolmogorov-Smirnov Z            |                | 1.356              |
| Asymp. Sig. (2-tailed)          |                | .051               |
| a. Test distribution is Normal. |                |                    |

## Oneway

### Test of Homogeneity of Variances

#### Persentase Monosit

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.029            | 5   | 24  | .111 |

### ANOVA

#### Persentase Monosit

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 902.363        | 5  | 180.473     | 82.133 | .000 |
| Within Groups  | 52.736         | 24 | 2.197       |        |      |
| Total          | 955.099        | 29 |             |        |      |

## Post Hoc Tests (Homogeneous Subsets)

### Persentase Monosit

#### Duncan

| Kelompok Perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |       |        |        |
|--------------------|---|-------------------------|-------|--------|--------|
|                    |   | 1                       | 2     | 3      | 4      |
| 5                  | 5 | 5.400                   |       |        |        |
| 3                  | 5 | 5.780                   |       |        |        |
| 6                  | 5 | 7.280                   | 7.280 |        |        |
| 4                  | 5 |                         | 8.360 |        |        |
| 2                  | 5 |                         |       | 16.520 |        |
| 1                  | 5 |                         |       |        | 19.500 |
| Sig.               |   | .069                    | .261  | 1.000  | 1.000  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

### 5.3. Persentase Eosinofil

#### Means

Case Processing Summary

|  | Cases    |         |          |         |       |         |
|--|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|  | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|  | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Persentase Eosinofil *<br>Kelompok Perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

#### Report

##### Persentase Eosinofil

| Kelompok Perlakuan | Mean   | N  | Std. Deviation |
|--------------------|--------|----|----------------|
| 1                  | 16.360 | 5  | 2.4317         |
| 2                  | 6.280  | 5  | 1.4167         |
| 3                  | 2.240  | 5  | .6066          |
| 4                  | 7.060  | 5  | 1.1718         |
| 5                  | 3.380  | 5  | .4868          |
| 6                  | 4.180  | 5  | .4658          |
| Total              | 6.583  | 30 | 4.8936         |

#### NPar Tests

##### One-Sample Kolmogorov-Smimov Test

|                                |                          | Persentase Eosinofil |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|
| N                              |                          | 30                   |
| Normal Parameters <sup>a</sup> | Mean                     | 6.583                |
|                                | Std. Deviation           | 4.8936               |
|                                | Most Extreme Differences |                      |
|                                | Absolute                 | .201                 |
|                                | Positive                 | .201                 |
|                                | Negative                 | -.146                |
| Kolmogorov-Smimov Z            |                          | 1.102                |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         |                          | .176                 |

a. Test distribution is Normal.

##### Test of Homogeneity of Variances

##### Persentase Eosinofil

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 4.067            | 5   | 24  | .008 |

##### Robust Tests of Equality of Means

##### Persentase Eosinofil

|                | Statistic <sup>a</sup> | df1 | df2   | Sig. |
|----------------|------------------------|-----|-------|------|
| Brown-Forsythe | 77.590                 | 5   | 9.954 | .000 |

a. Asymptotically F distributed.

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Persentase Eosinofil  
Games-Howell

| (I) Kelompok<br>Perlakuan | (J) Kelompok<br>Perlakuan | Mean Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                           |                           |                          |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1                         | 2                         | 10.0800                  | 1.2586     | .001 | 5.186                   | 14.974      |
|                           | 3                         | 14.1200                  | 1.1208     | .001 | 9.108                   | 19.132      |
|                           | 4                         | 9.3000                   | 1.2071     | .002 | 4.427                   | 14.173      |
|                           | 5                         | 12.9800                  | 1.1091     | .001 | 7.924                   | 18.036      |
|                           | 6                         | 12.1800                  | 1.1072     | .002 | 7.117                   | 17.243      |
| 2                         | 1                         | -10.0800                 | 1.2586     | .001 | -14.974                 | -5.186      |
|                           | 3                         | 4.0400                   | .6892      | .011 | 1.193                   | 6.887       |
|                           | 4                         | -.7800                   | .8222      | .922 | -3.811                  | 2.251       |
|                           | 5                         | 2.9000                   | .6699      | .048 | .026                    | 5.774       |
|                           | 6                         | 2.1000                   | .6669      | .147 | -.781                   | 4.981       |
| 3                         | 1                         | -14.1200                 | 1.1208     | .001 | -19.132                 | -9.108      |
|                           | 2                         | -4.0400                  | .6892      | .011 | -6.887                  | -1.193      |
|                           | 4                         | -4.8200                  | .5901      | .001 | -7.168                  | -2.472      |
|                           | 5                         | -1.1400                  | .3479      | .086 | -2.426                  | .146        |
|                           | 6                         | -1.9400                  | .3421      | .005 | -3.211                  | -.669       |
| 4                         | 1                         | -9.3000                  | 1.2071     | .002 | -14.173                 | -4.427      |
|                           | 2                         | .7800                    | .8222      | .922 | -2.251                  | 3.811       |
|                           | 3                         | 4.8200                   | .5901      | .001 | 2.472                   | 7.168       |
|                           | 5                         | 3.6800                   | .5675      | .007 | 1.323                   | 6.037       |
|                           | 6                         | 2.8800                   | .5639      | .022 | .519                    | 5.241       |
| 5                         | 1                         | -12.9800                 | 1.1091     | .001 | -18.036                 | -7.924      |
|                           | 2                         | -2.9000                  | .6699      | .048 | -5.774                  | -.026       |
|                           | 3                         | 1.1400                   | .3479      | .086 | -.146                   | 2.426       |
|                           | 4                         | -3.6800                  | .5675      | .007 | -6.037                  | -1.323      |
|                           | 6                         | -.8000                   | .3013      | .188 | -1.902                  | .302        |
| 6                         | 1                         | -12.1800                 | 1.1072     | .002 | -17.243                 | -7.117      |
|                           | 2                         | -2.1000                  | .6669      | .147 | -4.981                  | .781        |
|                           | 3                         | 1.9400                   | .3421      | .005 | .669                    | 3.211       |
|                           | 4                         | -2.8800                  | .5639      | .022 | -5.241                  | -.519       |
|                           | 5                         | .8000                    | .3013      | .188 | -.302                   | 1.902       |

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



## 5.4. Persentase Basofil

### Means

Case Processing Summary

|  | Cases    |         |          |         |       |         |
|--|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|  | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|  | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Persentase Basofil *<br>Kelompok Perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

### Report

#### Persentase Basofil

| Kelompok Perlakuan | Mean  | N  | Std. Deviation |
|--------------------|-------|----|----------------|
| 1                  | 7.200 | 5  | 1.9313         |
| 2                  | 3.660 | 5  | 1.6349         |
| 3                  | 1.260 | 5  | .5595          |
| 4                  | 3.040 | 5  | .4827          |
| 5                  | 2.220 | 5  | .2168          |
| 6                  | 2.340 | 5  | .3286          |
| Total              | 3.287 | 30 | 2.1711         |

### NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smimov Test

|                                 |                          | Persentase Basofil |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------|
| N                               |                          | 30                 |
| Normal Parameters <sup>a</sup>  | Mean                     | 3.287              |
|                                 | Std. Deviation           | 2.1711             |
|                                 | Most Extreme Differences |                    |
|                                 | Absolute                 | .264               |
|                                 | Positive                 | .264               |
|                                 | Negative                 | -.128              |
| Kolmogorov-Smimov Z             |                          | 1.447              |
| Asymp. Sig. (2-tailed)          |                          | .030               |
| a. Test distribution is Normal. |                          |                    |

### Test of Homogeneity of Variances

#### Persentase Basofil

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 4.895            | 5   | 24  | .003 |

### Robust Tests of Equality of Means

#### Persentase Basofil

|                | Statistic <sup>a</sup> | df1 | df2   | Sig. |
|----------------|------------------------|-----|-------|------|
| Brown-Forsythe | 18.290                 | 5   | 9.511 | .000 |

a. Asymptotically F distributed.

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Persentase Basofil  
Games-Howell

| (I) Kelompok<br>Perlakuan | (J) Kelompok<br>Perlakuan | Mean Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                           |                           |                          |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1                         | 2                         | 3.5400*                  | 1.1316     | .103 | -.623                   | 7.703       |
|                           | 3                         | 5.9400*                  | .8992      | .010 | 1.987                   | 9.893       |
|                           | 4                         | 4.1600*                  | .8903      | .043 | .179                    | 8.141       |
|                           | 5                         | 4.9800*                  | .8691      | .025 | .912                    | 9.048       |
|                           | 6                         | 4.8600*                  | .8761      | .026 | .825                    | 8.895       |
| 2                         | 1                         | -3.5400*                 | 1.1316     | .103 | -7.703                  | .623        |
|                           | 3                         | 2.4000                   | .7728      | .152 | -.918                   | 5.718       |
|                           | 4                         | .6200                    | .7624      | .952 | -2.723                  | 3.963       |
|                           | 5                         | 1.4400                   | .7376      | .481 | -1.995                  | 4.875       |
|                           | 6                         | 1.3200                   | .7458      | .556 | -2.079                  | 4.719       |
| 3                         | 1                         | -5.9400*                 | .8992      | .010 | -9.893                  | -1.987      |
|                           | 2                         | -2.4000                  | .7728      | .152 | -5.718                  | .918        |
|                           | 4                         | -1.7800*                 | .3305      | .006 | -2.994                  | -.566       |
|                           | 5                         | -.9600                   | .2683      | .091 | -2.089                  | .169        |
|                           | 6                         | -1.0800                  | .2902      | .060 | -2.207                  | .047        |
| 4                         | 1                         | -4.1600*                 | .8903      | .043 | -8.141                  | -.179       |
|                           | 2                         | -.6200                   | .7624      | .952 | -3.963                  | 2.723       |
|                           | 3                         | 1.7800*                  | .3305      | .006 | .566                    | 2.994       |
|                           | 5                         | .8200                    | .2366      | .095 | -.149                   | 1.789       |
|                           | 6                         | .7000                    | .2612      | .193 | -.287                   | 1.687       |
| 5                         | 1                         | -4.9800*                 | .8691      | .025 | -9.048                  | -.912       |
|                           | 2                         | -1.4400                  | .7376      | .481 | -4.875                  | 1.995       |
|                           | 3                         | .9600                    | .2683      | .091 | -.169                   | 2.089       |
|                           | 4                         | -.8200                   | .2366      | .095 | -1.789                  | .149        |
|                           | 6                         | -.1200                   | .1761      | .979 | -.789                   | .549        |
| 6                         | 1                         | -4.8600*                 | .8761      | .026 | -8.895                  | -.825       |
|                           | 2                         | -1.3200                  | .7458      | .556 | -4.719                  | 2.079       |
|                           | 3                         | 1.0800                   | .2902      | .060 | -.047                   | 2.207       |
|                           | 4                         | -.7000                   | .2612      | .193 | -1.687                  | .287        |
|                           | 5                         | .1200                    | .1761      | .979 | -.549                   | .789        |

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## 5.5. Persentase Neutrofil

### Means

#### Case Processing Summary

|  | Cases    |         |          |         |       |         |
|--|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|  | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|  | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Persentase Neutrofil *<br>Kelompok perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

#### Report

#### Persentase Neutrofil

| Kelompok perlakuan | Mean   | N  | Std. Deviation |
|--------------------|--------|----|----------------|
| 1                  | 22.300 | 5  | 4.2819         |
| 2                  | 13.280 | 5  | 2.4108         |
| 3                  | 5.580  | 5  | .7662          |
| 4                  | 10.700 | 5  | .9849          |
| 5                  | 9.860  | 5  | 2.2233         |
| 6                  | 11.300 | 5  | 2.1622         |
| Total              | 12.170 | 30 | 5.6292         |

### NPar Tests

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                |                          | Persentase Neutrofil |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|
| N                              |                          | 30                   |
| Normal Parameters <sup>a</sup> | Mean                     | 12.170               |
|                                | Std. Deviation           | 5.6292               |
|                                | Most Extreme Differences |                      |
|                                | Absolute                 | .182                 |
|                                | Positive                 | .182                 |
|                                | Negative                 | -.092                |
| Kolmogorov-Smirnov Z           |                          | .995                 |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         |                          | .275                 |

a. Test distribution is Normal.

#### Test of Homogeneity of Variances

#### Persentase Neutrofil

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.713            | 5   | 24  | .044 |

#### Robust Tests of Equality of Means

#### Persentase Neutrofil

|                | Statistic <sup>a</sup> | df1 | df2    | Sig. |
|----------------|------------------------|-----|--------|------|
| Brown-Forsythe | 26.419                 | 5   | 11.953 | .000 |

a. Asymptotically F distributed.

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Persentase Neutrofil  
Games-Howell

| (I) Kelompok perlakuan | (J) Kelompok perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|------------------------|------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                        |                        |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| 1                      | 2                      | 9.0200                | 2.1976     | .041 | .418                    | 17.622      |
|                        | 3                      | 16.7200               | 1.9454     | .005 | 7.786                   | 25.654      |
|                        | 4                      | 11.6000               | 1.9649     | .018 | 2.743                   | 20.457      |
|                        | 5                      | 12.4400               | 2.1577     | .009 | 3.858                   | 21.022      |
|                        | 6                      | 11.0000               | 2.1452     | .016 | 2.420                   | 19.580      |
| 2                      | 1                      | -9.0200               | 2.1976     | .041 | -17.622                 | -.418       |
|                        | 3                      | 7.7000                | 1.1313     | .008 | 2.789                   | 12.611      |
|                        | 4                      | 2.5800                | 1.1646     | .359 | -2.272                  | 7.432       |
|                        | 5                      | 3.4200                | 1.4666     | .283 | -1.948                  | 8.788       |
|                        | 6                      | 1.9800                | 1.4482     | .744 | -3.327                  | 7.287       |
| 3                      | 1                      | -16.7200              | 1.9454     | .005 | -25.654                 | -7.786      |
|                        | 2                      | -7.7000               | 1.1313     | .008 | -12.611                 | -2.789      |
|                        | 4                      | -5.1200               | .5580      | .000 | -7.191                  | -3.049      |
|                        | 5                      | -4.2800               | 1.0517     | .061 | -8.790                  | .230        |
|                        | 6                      | -5.7200               | 1.0259     | .017 | -10.100                 | -1.340      |
| 4                      | 1                      | -11.6000              | 1.9649     | .018 | -20.457                 | -2.743      |
|                        | 2                      | -2.5800               | 1.1646     | .359 | -7.432                  | 2.272       |
|                        | 3                      | 5.1200                | .5580      | .000 | 3.049                   | 7.191       |
|                        | 5                      | .8400                 | 1.0875     | .962 | -3.623                  | 5.303       |
|                        | 6                      | -.6000                | 1.0625     | .990 | -4.937                  | 3.737       |
| 5                      | 1                      | -12.4400              | 2.1577     | .009 | -21.022                 | -3.858      |
|                        | 2                      | -3.4200               | 1.4666     | .283 | -8.788                  | 1.948       |
|                        | 3                      | 4.2800                | 1.0517     | .061 | -.230                   | 8.790       |
|                        | 4                      | -.8400                | 1.0875     | .962 | -5.303                  | 3.623       |
|                        | 6                      | -1.4400               | 1.3869     | .892 | -6.508                  | 3.628       |
| 6                      | 1                      | -11.0000              | 2.1452     | .016 | -19.580                 | -2.420      |
|                        | 2                      | -1.9800               | 1.4482     | .744 | -7.287                  | 3.327       |
|                        | 3                      | 5.7200                | 1.0259     | .017 | 1.340                   | 10.100      |
|                        | 4                      | .6000                 | 1.0625     | .990 | -3.737                  | 4.937       |
|                        | 5                      | 1.4400                | 1.3869     | .892 | -3.628                  | 6.508       |

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## LAMPIRAN 6. Analisis data uji fagositosis makrofag

### 6.1. Aktivitas fagositosis

#### Means

Case Processing Summary

|   | Cases    |         |          |         |       |         |
|---|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|   | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|   | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Aktivitas Fagositosis *<br>Kelompok perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

#### Report

##### Aktivitas Fagositosis

| Kelompok perlakuan | Mean   | N  | Std. Deviation |
|--------------------|--------|----|----------------|
| 1                  | 5.380  | 5  | .8927          |
| 2                  | 10.600 | 5  | 1.2450         |
| 3                  | 8.900  | 5  | 3.9749         |
| 4                  | 6.380  | 5  | .5450          |
| 5                  | 7.800  | 5  | 1.3509         |
| 6                  | 15.600 | 5  | 1.6733         |
| Total              | 9.110  | 30 | 3.8489         |

#### NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                 |                | Aktivitas Fagositosis |
|---------------------------------|----------------|-----------------------|
| N                               |                | 30                    |
| Normal Parameters <sup>a</sup>  | Mean           | 9.110                 |
|                                 | Std. Deviation | 3.8489                |
| Most Extreme Differences        | Absolute       | .178                  |
|                                 | Positive       | .178                  |
|                                 | Negative       | -.119                 |
| Kolmogorov-Smirnov Z            |                | .975                  |
| Asymp. Sig. (2-tailed)          |                | .297                  |
| a. Test distribution is Normal. |                |                       |

#### Oneway

Test of Homogeneity of Variances

##### Aktivitas Fagositosis

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.627            | 5   | 24  | .191 |

**ANOVA**

**Aktivitas Fagositosis**

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 337.331        | 5  | 67.466      | 17.547 | .000 |
| Within Groups  | 92.276         | 24 | 3.845       |        |      |
| Total          | 429.607        | 29 |             |        |      |

**Post Hoc Tests (Homogeneous Subsets)**

**Aktivitas Fagositosis**

**Duncan**

| Kelompok perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |       |        |        |
|--------------------|---|-------------------------|-------|--------|--------|
|                    |   | 1                       | 2     | 3      | 4      |
| 1                  | 5 | 5.380                   |       |        |        |
| 4                  | 5 | 6.380                   | 6.380 |        |        |
| 5                  | 5 | 7.800                   | 7.800 |        |        |
| 3                  | 5 |                         | 8.900 | 8.900  |        |
| 2                  | 5 |                         |       | 10.600 |        |
| 6                  | 5 |                         |       |        | 15.600 |
| Sig.               |   | .076                    | .065  | .183   | 1.000  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**6.2. Kapasitas fagositosis**

**Means**

**Case Processing Summary**

|   | Cases    |         |          |         |       |         |
|---|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|   | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|   | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Kapasitas Fagositosis *<br>Kelompok perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

**Report**

**Kapasitas Fagositosis**

| Kelompok perlakuan | Mean    | N  | Std. Deviation |
|--------------------|---------|----|----------------|
| 1                  | 81.380  | 5  | 5.9621         |
| 2                  | 102.900 | 5  | 6.3285         |
| 3                  | 90.600  | 5  | 6.5803         |
| 4                  | 100.760 | 5  | 6.2500         |
| 5                  | 131.900 | 5  | 10.4964        |
| 6                  | 129.300 | 5  | 6.8702         |
| Total              | 106.140 | 30 | 20.1127        |

## NPar Tests

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                |                | Kapasitas Fagositosis |
|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| N                              |                | 30                    |
| Normal Parameters <sup>a</sup> | Mean           | 106.140               |
|                                | Std. Deviation | 20.1127               |
| Most Extreme Differences       | Absolute       | .116                  |
|                                | Positive       | .115                  |
|                                | Negative       | -.116                 |
| Kolmogorov-Smirnov Z           |                | .633                  |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         |                | .818                  |

a. Test distribution is Normal.

## Oneway

### Test of Homogeneity of Variances

#### Kapasitas Fagositosis

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .181             | 5   | 24  | .967 |

### ANOVA

#### Kapasitas Fagositosis

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 10469.772      | 5  | 2093.954    | 39.842 | .000 |
| Within Groups  | 1261.340       | 24 | 52.556      |        |      |
| Total          | 11731.112      | 29 |             |        |      |

## Post Hoc Tests

### Kapasitas Fagositosis

#### Duncan

| Kelompok perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |
|--------------------|---|-------------------------|---------|---------|
|                    |   | 1                       | 2       | 3       |
| 1                  | 5 | 81.380                  |         |         |
| 3                  | 5 | 90.600                  |         |         |
| 4                  | 5 |                         | 100.760 |         |
| 2                  | 5 |                         | 102.900 |         |
| 6                  | 5 |                         |         | 129.300 |
| 5                  | 5 |                         |         | 131.900 |
| Sig.               |   | .056                    | .645    | .576    |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## LAMPIRAN 7. Analisis data nilai OD antibodi

### Means

#### Case Processing Summary

|                                  | Cases    |         |          |         |       |         |
|----------------------------------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|                                  | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|                                  | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| OD Antibodi * Kelompok perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

### Report

#### OD Antibodi

| Kelompok perlakuan | Mean    | N  | Std. Deviation |
|--------------------|---------|----|----------------|
| 1                  | .59160  | 5  | .042099        |
| 2                  | .64160  | 5  | .025832        |
| 3                  | 1.04480 | 5  | .054847        |
| 4                  | 1.03320 | 5  | .125643        |
| 5                  | 1.12700 | 5  | .040639        |
| 6                  | 1.23160 | 5  | .097562        |
| Total              | .94497  | 30 | .254568        |

### NPar Tests

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                |                | OD Antibodi |
|--------------------------------|----------------|-------------|
| N                              |                | 30          |
| Normal Parameters <sup>a</sup> | Mean           | .94497      |
|                                | Std. Deviation | .254568     |
| Most Extreme Differences       | Absolute       | .214        |
|                                | Positive       | .183        |
|                                | Negative       | -.214       |
| Kolmogorov-Smirnov Z           |                | 1.174       |
| Asymp. Sig. (2-tailed)         |                | .127        |

a. Test distribution is Normal.

### Oneway

#### Test of Homogeneity of Variances

#### OD Antibodi

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.892            | 5   | 24  | .133 |



**ANOVA**

| OD Antibodi    | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 1.750          | 5  | .350        | 64.797 | .000 |
| Within Groups  | .130           | 24 | .005        |        |      |
| Total          | 1.879          | 29 |             |        |      |

**Post Hoc Tests**

**OD Antibodi**

**Duncan**

| Kelompok perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |
|--------------------|---|-------------------------|---------|---------|
|                    |   | 1                       | 2       | 3       |
| 1                  | 5 | .59160                  |         |         |
| 2                  | 5 | .64160                  |         |         |
| 4                  | 5 |                         | 1.03320 |         |
| 3                  | 5 |                         | 1.04480 |         |
| 5                  | 5 |                         | 1.12700 |         |
| 6                  | 5 |                         |         | 1.23160 |
| Sig.               |   | .293                    | .067    | 1.000   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## LAMPIRAN 8. Analisis data nilai OD IFN- $\gamma$

### Means

Case Processing Summary

|                                | Cases    |         |          |         |       |         |
|--------------------------------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|                                | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|                                | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| IFN-gamma * Kelompok perlakuan | 30       | 100.0%  | 0        | .0%     | 30    | 100.0%  |

### Report

#### IFN-gamma

| Kelompok perlakuan | Mean    | N  | Std. Deviation |
|--------------------|---------|----|----------------|
| 1                  | .56560  | 5  | .006804        |
| 2                  | .64240  | 5  | .018730        |
| 3                  | 1.09120 | 5  | .017712        |
| 4                  | 1.08900 | 5  | .085484        |
| 5                  | 1.18500 | 5  | .004637        |
| 6                  | 1.24760 | 5  | .030237        |
| Total              | .97013  | 30 | .272334        |

### NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                 |                | IFN-gamma |
|---------------------------------|----------------|-----------|
| N                               |                | 30        |
| Normal Parameters <sup>a</sup>  | Mean           | .97013    |
|                                 | Std. Deviation | .272334   |
| Most Extreme Differences        | Absolute       | .240      |
|                                 | Positive       | .209      |
|                                 | Negative       | -.240     |
| Kolmogorov-Smirnov Z            |                | 1.316     |
| Asymp. Sig. (2-tailed)          |                | .062      |
| a. Test distribution is Normal. |                |           |

### Test of Homogeneity of Variances

#### IFN-gamma

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 8.531            | 5   | 24  | .000 |

## ANOVA

| IFN-gamma      |                |    |             |         |      |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
| Between Groups | 2.115          | 5  | .423        | 283.444 | .000 |
| Within Groups  | .036           | 24 | .001        |         |      |
| Total          | 2.151          | 29 |             |         |      |

## IFN-gamma

## Duncan

| Kelompok perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |        |         |         |         |
|--------------------|---|-------------------------|--------|---------|---------|---------|
|                    |   | 1                       | 2      | 3       | 4       | 5       |
| 1                  | 5 | .56560                  |        |         |         |         |
| 2                  | 5 |                         | .64240 |         |         |         |
| 4                  | 5 |                         |        | 1.08900 |         |         |
| 3                  | 5 |                         |        | 1.09120 |         |         |
| 5                  | 5 |                         |        |         | 1.18500 |         |
| 6                  | 5 |                         |        |         |         | 1.24760 |
| Sig.               |   | 1.000                   | 1.000  | .929    | 1.000   | 1.000   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



