

DISERTASI

PENGARUH ALKIL BENZEN SULFONAT DALAM DETERJEN TERHADAP RESPONS IMUN MUKOSA USUS MENCIT MUS MUSCULUS BALB/c

PARADIGMA PATOBIOLOGIS YANG BERKONSEP PADA *STRESS CELL*

KK

DIK K 37/02.

SM

P.



Oleh

ENDANG SRIWAHYUNI
099311475 D.

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA
1999

**PENGARUH ALKIL BENZEN SULFONAT DALAM
DETERJEN TERHADAP RESPONS IMUN MUKOSA
USUS MENCIT MUS MUSCULUS BALB/c**

PARADIGMA PATOBIOLOGIS YANG BERKONSEP PADA *STRESS CELL*

Disertasi
Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
di bawah pimpinan Rektor Universitas Airlangga

Prof. H. Soedarto dr, DTM & H,Ph D

Untuk dipertahankan di hadapan
Rapat Terbuka Senat Universitas Airlangga



Oleh

ENDANG SRIWAHYUNI
099311475 D.

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA
1999**

LEMBAR PENGESAHAN

Disertasi ini telah disetujui

Tanggal : 30 Maret 1999

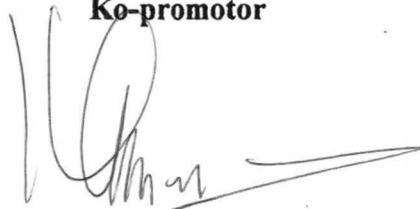
Oleh :

Promotor



Prof. Dr. R. Pitono Soeparto, dr.
NIP. 130 206 153

Ko-promotor



Dr. Suhartono Taat Putra, dr.MS
NIP. 130 934 628

Telah diuji pada ujian tertutup
Tanggal 2 Maret 1999

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Roemwerdiniadi Soedoko, dr

Anggota : 1. Prof. Dr. R Pitono Suparto, dr
2. Dr. Suhartono Taat Putra, dr
3. Prof. Rahmat Santoso, dr
4. Prof. Dr. R. Moeljono Notoedirdjo, dr DSS DSJ MPH
5. Prof. Dr. JB Supariyatmo, dr
6. Dr. FM Judajana, dr

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 1559/J03/PP/199
Tanggal : 10 Maret 1999

*Kupersembahkan untuk :
Almamater
Guru-guruku
Suami dan Kedua putriku Tercinta
Ibu dan Almarhum Ayah
Saudara dan teman-temanku*

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan segala kerendahan hati saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan kepada saya, sehingga mendapatkan kekuatan serta tuntunanNya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Pertama kali saya sampaikan penghargaan serta ucapan terima kasih kepada pemerintah Indonesia c.q Menteri Negara Lingkungan Hidup yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana pendidikan kepada saya dalam mengikuti pendidikan di Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Kepada Rektor Universitas Airlangga Prof. H Soedarto, dr, DTM & H PhD dan mantan rektor Prof. H Bambang Rahino Setokoesoemo, dr yang telah memberi ijin dan berkenan menerima saya sebagai mahasiswa Pascasarjana di Universitas Airlangga periode 1993/1994.

Kepada Prof. Dr. H Soedijono Tirtowidardjo, dr Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, serta Prof. Dr. H Soetarjadi, Apt mantan direktur Program Pascasarjana dan staf, yang telah memberikan kesempatan dan dorongan kepada saya untuk mengikuti pendidikan di Pasca sarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Kepada Prof. Dr. R Pitono Soeparto, dr, selaku pembimbing utama dan Prof. Dr. Thomas Kardjito, dr, selaku mantan pembimbing utama, yang telah membimbing, membantu, dan memberikan dorongan dari awal hingga selesainya penelitian dan penulisan disertasi ini.

Kepada Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS selaku ko promotor yang dengan sangat sabar dan penuh perhatian membimbing, mulai dari pelaksanaan penelitian sampai selesai, kemudian mendorong, membantu, dan menambah wawasan ilmu dalam penulisan disertasi ini.

Kepada Prof. Dr. Eka Afnan Troena, SE, Rektor Universitas Brawijaya Malang dan Prof. Hasyim Baisoeni, drs, mantan rektor Universitas Brawijaya Malang, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program doktor ini.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Achmad Rudianto, dr, DSPD dan mantan dekan Moh. Hidayat, dr, DSBO, yang telah memberikan ijin kepada saya untuk mengikuti pendidikan program doktor.

Kepada Soediartha, dr, MS, selaku Kepala Bagian Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, serta seluruh staf dan karyawan bagian ilmu faal atas kesempatan dan bantuan yang diberikan kepada saya dalam rangka pendidikan program doktor.

Kepada I Ketut Suidiana, Drs, Msi; Tania Ardiani, Dra, MS, yang telah meluangkan waktu dan tenaganya membantu selesainya penelitian untuk disertasi ini.

Kepada Prof. H Purnomo Suryohudoyo, dr; Prof. Rahmat Santoso, dr; Prof. Dr. Roem Werdiniadi Soedoko, dr; Prof. Dr. R Moeljono Notosoedirdjo, dr, MPH; Dr. Ami Soewandi JS; Dr. Bambang Poernomo, drh; Dr. Soeprapto Ma'at, Apt, MS; Dr. FM Judajana, dr, MS; Dr. M Zainuddin, Apt MS; Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr, MS; Fuad Amsyari, dr, MPH PhD; Prof Eddy Pranowo, dr, MPH; Prof Abdoel

Gani SH; Dr. Irwan Setiabudi, dr; Widodo Jatim Pudjirahardjo, dr, Dr, PH; Dr. Sunarko Setyawan, dr, MS; Sugeng Sukamto, dr, MSc, PhD; Subiyanto Martosoe-darmo, dr, SpA; Dr. Slamet Priyanto, dr; Chaerul Anwar, drh, MS; Sutiman BS Drs, SU, DSc; Dr. I Ketut Gede Muliarta, dr; dan Eddy Priyo Utomo, Drs, MS; yang telah memberi bantuan, bimbingan, dan waktu, dalam menyelesaikan disertasi ini.

Kepada seluruh staf Gramik dan staf Seksi/Devisi Patobiologi Lab. Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD dr. Sutomo Surabaya yang telah memberikan bantuan sarana dan prasarana untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Kepada Kepala Laboratorium Dasar Bersama Unair, Kepala Laboratorium Patologi Anatomi F.K. Unair dan Kepala Laboratorium Histologi F.K. Unair, yang telah memberikan bantuan fasilitas dan sarana untuk penyelesaian penelitian saya.

Kepada Sdr. Abdul Kholik, Ahli Madya bidang Statistik, staf Laboratorium Komputasi Jurusan Statistik Fak. MIPA ITS yang telah membantu dalam analisis data penelitian untuk disertasi ini.

Kepada seluruh staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah membantu penyelesaian penelitian dalam rangka pendidikan program doktor ini.

Kepada Prof Dr Wani Haditomo, Ir; Prof Dr Soedarmanto, Ir, dan seluruh staf PSL Unibraw yang telah memberi dukungan moril dalam menyelesaikan disertasi ini.

Pada kesempatan ini, tak lupa saya sampaikan terima kasih kepada segenap Bapak dan Ibu Guru Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, dan khususnya para Dosen serta Guru Besar Fakultas Kedokteran Universitas

Gadjah Mada Yogyakarta, Program Pasca sarjana Universitas Airlangga Surabaya, yang telah mendidik serta membimbing saya hingga menjadi dokter, magister, dan menyelesaikan program doktor.

Terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan atas bimbingan serta doa yang diberikan ibunda tercinta, Ibu Sriyamah serta almarhum ayahanda, Darsosoegito.

Terima kasih yang tak terhingga juga saya sampaikan kepada almarhum bapak dan ibu mertua, Suhud Yosoprawoto, serta suami tercinta, Poeranto, dr MKes, juga kedua putri saya tersayang, Pertiwi Febriana Chandrawati, S Ked, dan Novina Purwita Kartikarini yang telah mendorong dan memanjatkan doa serta memberikan semangat dalam menempuh pendidikan doktor ini.

Kepada keluarga, handai taulan, dan semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu namanya, baik secara langsung maupun tidak langsung telah ikut membantu saya dalam pelaksanaan penelitian memberikan dorongan serta doa, saya sekeluarga mengucapkan banyak terima kasih.

Akhir kata, semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karuniaNya kepada semua pihak yang telah membantu saya dengan ikhlas dalam menyelesaikan disertasi ini.

Amien amien ya robbal aalamin.

RINGKASAN

Telah diketahui bahwa Alkil Benzen Sulfonat (ABS) sebagai bahan baku deterjen merupakan salah satu bahan pencemar air sungai di Indonesia. Padahal air ini juga sebagai bahan baku sebagian besar Pabrik Pengolahan Air Minum, dan ternyata air hasil olahan tersebut masih mengandung ABS, yang kemudian akan dikonsumsi tubuh per-oral. Akumulasi bahan ini dalam waktu yang lama bisa berlaku sebagai *stressor* yang dapat mengganggu fungsi ketahanan mukosa usus yang dilakukan oleh lapisan mukosa usus sebagai pertahanan pertama terhadap imunogen per-oral, yang berupa sistem imun mukosa usus. Model berfikir yang berorientasi pada perubahan biologis yang tidak lazim yang terjadi pada tubuh sebagai akibat interaksinya individu dengan lingkungan merupakan paradigma patobiologis. ABS yang merupakan agen senobiotik toksik akan berlaku sebagai *stressor* dapat menyebabkan *stress cell* pada sel epitel mukosa dan sel M mukosa usus, yang akan mengakibatkan perubahan atau modulasi respons imun. Konsep tersebut merupakan kajian terhadap perubahan respons imun yang terjadi pada individu yaitu sel mukosa usus mencit yang berada dalam kondisi stres oleh ABS/LAS. Variabel yang ditetapkan atas dasar konsep sel yang mengalami stres tersebut diwujudkan dalam bentuk pola perubahan respons imun mukosal (PPRIM) yang dianalisis secara multivariat. Melalui penafsiran bentuk PPRIM tersebut, diharapkan mampu untuk mengungkap mekanisme perubahan respons imun mukosal karena *stressor* yang berupa deterjen (ABS/LAS).

Sebagai rumusan masalah adalah apakah paparan larutan Alkil Benzen Sulfonat (ABS/LAS) per-oral dapat menurunkan respons imun di mukosa usus

mencit. Dan apakah ada perbedaan perubahan respons imun mukosal yang terjadi pada paparan ABS per-oral dengan perubahan respons imun mukosal pada paparan LAS per-oral. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap mekanisme penurunan respons imun mukosa usus mencit akibat pemberian paparan ABS/LAS dalam deterjen per-oral. Adapun tujuan khusus dalam penelitian ini meliputi :

1. Membuktikan adanya penurunan komponen sistem imun mukosal yaitu limfosit T CD4, limfosit T CD8, sel NK, sel MØ, SP IgA, SP IgM & SP IgG akibat pemberian ABS dalam deterjen per-oral.
2. Mendapatkan pola penurunan respons imun mukosa usus mencit akibat paparan ABS/LAS dalam deterjen per-oral.
3. Menjelaskan penurunan respons imun mukosa akibat paparan ABS/ LAS dalam deterjen per-oral berdasar pada pola yang terjadi.

Penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan penelitian *the posttest-only control group design*. Sampel diambil secara random dari populasi mencit *Mus musculus BALB/c* jantan yang berumur 45-60 hari, dengan berat badan antara 25-35 gram, sejumlah 30 ekor, yang selanjutnya dibagi tiga kelompok secara random, yaitu kelompok yang diberi paparan ABS, kelompok yang diberi paparan LAS dan kelompok kontrol. Variabel bebas meliputi : pemberian per-oral larutan bahan aktif deterjen (ABS/LAS) sebanyak 0,1 ml yang berisi 6,25 mg setiap ekor mencit setiap hari selama 7 hari ber-turutan. Sedangkan variabel tergantung adalah variabel yang diharapkan dapat mencerminkan konsep *stress cell* yang meliputi limfosit T CD4, limfosit T CD8, SP IgA, SP IgM, SP IgG, sel NK (natural killer) dan sel MØ (makrofag).

Tahapan analisis untuk menjawab permasalahan berdasar tujuan penelitian meliputi : Uji Manova, analisis diskriminan dan uji pola. Hasil Uji Manova diperoleh bahwa ada perbedaan perubahan respons imun mukosal yang signifikan antara kelompok yang terpapar ABS dan kelompok yang terpapar LAS pada daerah induktif mukosal ($\alpha < 0,05$) maupun efektor mukosal ($\alpha < 0,05$). Hasil uji diskriminan pada daerah induktif mukosal mendapatkan 5 variabel pembeda yang meliputi limfosit T CD4, limfosit T CD8, sel NK, sel MØ, dan SP IgA yang diwujudkan dalam PPRIM, sedang pada daerah efektor mukosal mendapatkan 3 variabel pembeda yang meliputi SP IgG, limfosit T CD4 dan limfosit T CD8. Hasil uji manova pada respons imun atas dasar fungsi ditunjukkan dengan pengujian pada daerah induktif mukosal dan efektor mukosal pada semua komponen pola, masing-masing perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda ($\alpha < 0,05$). Untuk membuktikan perbedaan PPRIM pada kedua perlakuan tersebut diperlukan penafsiran pada masing-masing PPRIM. Paparan ABS dan LAS pada sistem imun mukosal dapat diamati pada 2 daerah yaitu daerah induktif dan daerah efektor. Perubahan daerah induktif mukosal lebih mencerminkan proses inisiasi/induksi dari sistem imun, sedang perubahan pada daerah efektor mukosal lebih mencerminkan bentuk efektifitas sistem imun mukosal (Stites, 1997; Hiroshi, 1994) seperti telah dilaporkan banyak peneliti bahwa ketahanan imunologis dimukosa didominasi oleh peran sekretori IgA walaupun tidak menutup kemungkinan peran CMI yang ada di mukosal. Hal ini didasarkan atas pertimbangan bahwa ketahanan imunologis yang ada di permukaan mukosa usus adalah S IgA (Tomasi, 1982; Ogra, 1994).

Hasil penelitian seperti terlihat pada analisis manova menunjukkan bahwa paparan ABS di induktif mukosal menyebabkan penurunan SP IgA, SP IgM, sel NK dan MØ. Dilihat dari mekanisme kerja biologisnya pada analisis diskriminan ternyata memberikan kontribusi peran yang positif pada semua komponen yang mempunyai nilai beda tinggi yaitu SP IgA, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK dan MØ.

Sedang paparan ABS di daerah efektor mukosal ternyata menekan hampir semua komponen sistem imun SP IgA, SP IgM, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK dan MØ, kecuali SP IgG.

Dan hasil penelitian pada paparan LAS di induktif mukosal menunjukkan efek penekanan pada setiap komponen sistem imun (SP IgM, SP IgG, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, dan sel MØ) kecuali SP IgA. Kalau dilihat dari mekanisme kerja (*action*) biologisnya, ternyata memberikan kontribusi peran yang positif pada SP IgA, limfosit T CD₄⁺, sel NK dan MØ kecuali pada komponen sitotoksik limfosit T CD₈⁺.

Paparan LAS pada daerah efektor mukosal, ternyata mensupresi semua komponen sel imun baik humoral maupun seluler SP IgA, SP IgM, SP IgG, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, dan MØ.

Dengan memperhatikan berbagai variabel baik humoral maupun seluler pada daerah induktif mukosal dan daerah efektor mukosal maka dapat disimpulkan bahwa paparan ABS ternyata lebih merusak SP IgA di induktif mukosal, sehingga peran IgA di efektor mukosal menjadi terabaikan. Mengingat imunitas pada permukaan mukosa didominasi oleh SP IgA maka ABS sangat merugikan sistem imunitas di mukosa

usus, sedangkan di dalam mukosa ABS relatif tidak terlalu merugikan imunitas seluler.

Sebagai kesimpulan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Perilaku ABS/LAS sebagai *stressor* merupakan stres terhadap sel M dan sel epitel mukosal, yang dapat menimbulkan perubahan respons imun mukosal.
2. Paradigma patobiologis yang berkonsep *stress cell* (Paradigma PNI) dapat digunakan untuk membuktikan dan mengungkap perubahan aktifitas sistem imun yang terpapar oleh ABS dan LAS.
3. Pola perubahan respons imun daerah induktif mukosal yang terjadi berbeda dengan daerah efektor mukosa usus mencit.
4. Pemberian ABS/LAS per-oral pada usus mencit akan memodulasi aktifitas sistem imun mukosal yang terjadi.
5. Pemberian ABS per-oral pada daerah induktif mukosa usus mencit , terjadi penekanan pada imunitas humoral yang ditunjukkan oleh penekanan pada SP IgA, sedang pada efektor mukosal terjadi penekanan pada imunitas humoral maupun imunitas seluler yang terlihat pada penurunan untuk semua komponen sistem imun.
6. Pemberian LAS per-oral pada daerah induktif mukosal menekan imunitas seluler yang dijelaskan oleh penekanan pada limfosit T CD₈⁺ sedang pada daerah efektor mukosal terjadi penekanan pada respons imunitas humoral maupun imunitas seluler yang ditunjukkan oleh penekanan pada semua komponen sistem imun.

ABSTRACT

In developed countries, the use of ABS as material source to produce detergent has been prohibited due to its toxicity effect, which is hazardous for human beings health. In Indonesia ABS is still used by most detergent industries as material source to produce detergent due to its lower cost and easy availability. Such industries and household still use rivers to dispose their detergent waste, which make those rivers exposed to ABS. At the same time, in Indonesia, rivers are still used as the largest source for water supply. Until now, ABS cannot be eradicated from water supply processed from ABS- exposed rivers. Up to this time, the effects of ABS exposure to gut mucous have not been disclosed. This study was intended to disclose such problem using experimental animals, which were exposed to ABS & LAS solution.

Because ABS is a genotoxic substance, this substance can act as cell stressor. If the cell is included in immunocompetence cell, stress may also occur in the immune system. Therefore, the author used pathobiological paradigm based on stress cell concept.

Immune system variables used in this study were T CD₄⁺ lymphocyte, T CD₈⁺ lymphocyte, SP IgA, SP IgM, SP IgG, NK and MØ.

Animals used in this study were thirty male mice, aged 45-60 days, which were divided into three groups. The first group was given 0.1 cc solution with 6.25 mg ABS per day, the second group was given 0.1 cc solution with 6.25 mg LAS per day, and the last one was given 0.1 with aqua per day, each for 7 days respectively.

Significant difference was evidence for the mucosal response immune between ABS exposed group and LAS exposed group on mucosal inductive area ($\alpha < 0.05$) and mucosal effective area are as well ($\alpha < 0.05$).

ABS treatment on mucosal inductive area could suppress humoral immunity, which was indicated by a decrease of SP IgA function, while on mucosal effective area, ABS suppress humoral and cellular immunity, which was shown by decrease of component T CD₄⁺ lymphocyte, T CD₈⁺ lymphocyte, SP IgA, SP IgM, NK and MØ.

LAS treatment on mucosal inductive area could suppress cellular immunity, which was indicated by decrease of T CD₈⁺ lymphocyte, while on mucosal effector area LAS could suppress humoral and cellular immunity, indicated by decrease of T CD₄⁺ lymphocyte, T CD₈⁺ lymphocyte, SP IgA, SP IgM, SP IgG, NK, and MØ.

Finally, this study, which use pathobiological paradigm based on stress cell concept on the modulation of immune system mucosal activity cause by ABS/LAS stressor, has proved the used of psychoneuroimmunologic concept in the system level. The new concept has also proved that the modulation of mucosal immune system may occur as the result of stress immunocompetence cells, as described by Putra (1999).

Keywords: ABS/LAS, stress cell, pathobiology, Psychoneuroimmunology

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xxi
DAFTAR GAMBAR	xxv
DAFTAR TABEL	xxvii
DAFTAR ISTILAH	xxviii
DAFTAR SINGKATAN	xxix
DAFTAR LAMPIRAN	xxx
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Deterjen	8
2.2 Alkil Benzen Sulfonat (ABS).....	11
2.2.1 Sifat dari ABS	14
2.3 Linier Alkil Benzen Sulfonat (LAS)	16
2.4 Air PDAM	16
2.5 Kelainan-kelainan yang terjadi akibat sindet	18
2.5.1 Kelainan pada hewan akibat ABS	18
2.5.2 Kelainan pada hewan akibat LAS	18
2.5.3 Kelainan pada manusia akibat deterjen	20
2.5.4 Toksikologi Benzen sebagai bahan pembentuk ABS	22
2.6 Oksidan dan Radikal Bebas	23
2.6.1 Macam & Asal pembentukan Radikal bebas	24
2.6.2 Dampak negatif Senyawa Oksigen Reaktif atau "ROS"	25
2.7 Cara kerja ABS didalam tubuh	27
2.7.1 Reaksi kimia pembentukan radikal yang terjadi pada ABS ...	28
2.7.2 Stres pada individu sel	29

2.8 Sistem Imun Mencit	33
2.9 Sistem Imun Tubuh	34
2.9.1 Respons Imun	34
2.9.2 Komponen Sel Pada Respons Imun	36
2.10 Faktor Pengubah Mekanisme Imun	37
2.11 Sistem Imun Mukosa Usus	38
2.11.1 Area Induktif Mukosal	43
2.11.2 Area Efektor Mukosal	44
2.12 Komponen <i>Soluble Mediators</i> dari Sistem Imun	46
2.12.1 Immunoglobulin (Ig)	46
2.12.2 Sitokin	49
2.13 Membran Sel Mukosa Usus	49
2.14 Teori Perkiraan Mekanisme Kerja ABS pada Mukosa usus	51
2.15 Paradigma Patobiologi Konsep Psikoneuroimunologis dengan dasar morfofungsi	53
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL & HIPOTESIS PENELITIAN.	57
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	57
Hipotesis Penelitian	59
BAB 4 METODE PENELITIAN	60
4.1 Metode Penelitian	60
4.1.1 Jenis Penelitian	60
4.1.2 Rancangan Penelitian	60
4.1.3 Pendekatan	62
4.2 Populasi, Sampel & Besar sampel	62
4.2.1 Populasi	62
4.2.2 Sampel	62
4.2.3 Besar Sampel	63
4.3 Tehnik Pengambilan Sampel	64
4.4 Identifikasi & pengukuran variabel	65
4.4.1 Skema hubungan antara variabel	65
4.4.2 Klasifikasi Variabel	65
4.4.3 Definisi Operasional Variabel	66
4.4.4 Bahan Penelitian	67
4.5 Tata Laksana Penelitian	67

4.5.1 Penelitian Pendahuluan untuk memilih dosis penelitian	67
4.5.2 Pemeliharaan mencit	68
4.5.3 Persiapan hewan uji	69
4.5.4 Penanganan selama pengujian	70
4.6 Tempat dan waktu penelitian	70
4.6.1 Tempat penelitian	70
4.6.2 Waktu Penelitian	71
4.6.3 Jadwal Kegiatan	72
4.7 Prosedur pengambilan atau Pengumpulan Data	72
4.8 Pemeriksaan respons imun	73
4.9 Tehnik Analisis Data	73
4.9.1 Uji Homogenitas	74
4.9.2 Uji Normalitas	74
4.9.3 Uji Konsistensi Pengamatan	74
4.9.4 Uji Perbedaan antara Kelompok Sampel	75
4.9.5 Uji Diskriminan	75
4.9.6 Pembuatan Pola Respons imun Patobiologik	75
4.9.7 Problem Ketepatan Pengukuran	76
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS	78
5.1 Hasil Penelitian Kriteria Sampel	78
5.2 Hasil Uji Statistik Sampel	78
5.2.1 Uji Homogenitas Sampel	78
5.2.2 Hasil Uji Normalitas	79
5.2.3 Uji Kejagan/Konsistensi Pengamat	80
5.2.4 Hasil Uji Perbedaan Antar Kelompok Sampel	81
5.2.5 Uji Diskriminan Untuk Identifikasi Variabel Pembeda.....	84
5.2.6 Pembuatan Pola Perubahan Respons imun	86
BAB 6 PEMBAHASAN	95

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	108
1. Kesimpulan	108
2. Saran	109
DAFTAR PUSTAKA	110
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

		Hal.
Gambar	1. Skema proses produksi air minum pada Perusahaan Daerah Air Minum Ngagel Surabaya.	17
Gambar	2. Diagram dari " <i>Peyer's patches</i> " (Walker Smith, 1986).	42
Gambar	3. Grafik Rerata setiap variabel perubahan psikoneuroimunologis sel yang mengalami stres pada daerah induktif mukosal	83
Gambar	4. Grafik Rerata setiap variabel perubahan psikoneuroimunologis pada sel yang mengalami stres pada daerah efektor mukosal	84
Gambar	5. Grafik pola perubahan psikoneuroimunologis pada sel yang mengalami stres daerah induktif mukosa.	88
Gambar	6. Grafik pola perubahan psikoneuroimunologis pada sel yang mengalami stres daerah efektor mukosa.	90
Gambar 7.1	Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian LAS di daerah efektor mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak SPIgA dengan pembesaran 400 kali.	91
Gambar 7.2	Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah efektor mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak SPIgG dengan pembesaran 400 kali.	92

Gambar 7.3	Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah induktif mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak SPIgM dengan pembesaran 400 kali.	92
Gambar 7.4	Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah enduktif mukosal pada irisan jaringan segar dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak limfosit T CD4 ⁺ dengan pembesaran 400 kali.	93
Gambar 7.5	Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian LAS di daerah efektor mukosal pada irisan jaringan segar dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak limfosit T CD8 ⁺ dengan pembesaran 400 kali.	93
Gambar 7.6	Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah efektor mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak sel NK dengan pembesaran 400 kali.	94
Gambar 7.7	Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian LAS di daerah enduktif mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan hemaktosilin eosin, tampak makrofag dengan pembesaran 400 kali.	94

DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 1. Hasil Uji Kolmogorov masing-masing variabel.	79
Tabel 2. Uji homogenitas Data – Univariate F Test.	81
Tabel 3. Harga Rerata, Simpang Baku Setiap variabel Perubahan psikoneuroimunologis dari 7 Variabel pada daerah Induktif Mukosal.	82
Tabel 4. Harga Rerata, Simpang baku Setiap Variabel Perubahan psikoneuroimunologis dari 7 Variabel pada daerah Efektor Mukosal.	83
Tabel 5. Tabel Rekapitulasi daerah induktif	85
Tabel 6. Tabel rekapitulasi daerah efektor	86
Tabel 7. Rerata dan Simpang Baku Diskriminan Variabel Pola Perubahan psikoneuroimunologis dengan 5 variabel pembeda pada daerah Induktif Mukosal.	87
Tabel 8. Rerata dan Simpang baku Diskriminan Variabel Pola Perubahan psikoneuroimunologis dengan 6 variabel pembeda pada daerah efektor mukosal.	89

DAFTAR ISTILAH

Patobiologi : adalah ilmu yang mempelajari perubahan biologik yang tidak lazim didalam tubuh akibat interaksi individu dengan lingkungannya. Dalam penelitian perubahan disebabkan akibat perlakuan (Rolla & Marino, 1980).

Patobiogenesis : adalah proses kejadian dari perubahan biologik yang merugikan akibat perlakuan yang diberikan. (Rolla & Marino, 1980).

Respons Imun Mukosal : adalah respons imun di mukosa yang dibentuk oleh sistem imun di mukosa. (Strober, 1991).

Pola Perubahan Respons Imun Mukosal : adalah pola yang terdiri atas komposisi perubahan variabel respns imun yang dominan dan saling melengkapi yang mencerminkan kontribusinya pada mekanisme proses biologik perubahan respons imun di mukosa. (Putra, 1990).

Pemeriksaan Morfofungsi : adalah pemeriksaan terhadap perubahan morfologi sel yang fungsional. (Iskandar, Widodo, Putra, 1997).

DAFTAR SINGKATAN

PPRIM	:	Pola Perubahan Respons Imun Mukosal
PNI	:	Psikoneuroimunologis
ABS	:	Alkil Benzen Sulfonat
LAS	:	Linier Alkil Benzen Sulfonat
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
MØ	:	Makrofag
NK	:	<i>Natural Killer</i>
SP gA	:	Sel plasma Immunoglobulin A
SP IgM	:	Sel plasma Immunoglobulin M
SP IgG	:	Sel plasma Immunoglobulin G
MHC	:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
HPA	:	<i>Hypothalamic – Pituitary - Adrenal</i>
IL	:	Interleukin
Th	:	T helper

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1.1 Data Laboratorium kualitas PDAM pada :
tanggal 7 Januari 1995
- Lampiran 1.2 Data Laboratorium kualitas PDAM pada :
tanggal 26 April 1995
- Lampiran 1.3 Data Laboratorium kualitas PDAM pada :
tanggal 16 Oktober 1995
- Lampiran 1.4 Data Laboratorium kualitas PDAM pada :
tanggal 14 Agustus 1996
- Lampiran 1.5 Data Laboratorium kualitas PDAM pada :
tanggal 2 – 6 Desember 1996
- Lampiran 2.1 Hasil Uji Homogenitas Sampel (Berat Badan)
- Lampiran 2.2 Hasil Uji Homogenitas Sampel (Umur)
- Lampiran 3 Hasil Uji Normalitas
- Lampiran 4 Hasil Uji Keajegan Pengamat
- Lampiran 5 Hasil Uji beda antar kelompok sampel pada induktif mukosal
- Lampiran 6 Hasil Uji beda antar kelompok sampel pada efektor mukosal
- Lampiran 7 Hasil Uji Analisa Diskriminan daerah induktif Mukosal
- Lampiran 8 Hasil Uji Analisa Diskriminan daerah efektor Mukosal
- Lampiran 9 Hasil Uji Pola pada daerah induktif Mukosal
- Lampiran 10 Hasil Uji Pola pada daerah efektor Mukosal
- Lampiran 11 Tehnik Pembuatan Sediaan Histologi
- Lampiran 12 Tehnik Pembuatan Sediaan Imunohistologi

B A B 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Alkil Benzen Sulfonat (ABS) sebagai bahan baku deterjen merupakan salah satu bahan pencemar air sungai di Indonesia (Partoatmodjo, 1979; Sutamiharjo, 1983). Ada dua bentuk Alkil Benzen Sulfonat yang digunakan sebagai bahan baku deterjen sintesis (sindet) ini yaitu ABS rantai bercabang yang lazim disebut ABS saja yang mempunyai sifat *non biodegradable*, dan ABS rantai lurus yang biasanya disebut sebagai LAS (*Linear Alkyl Benzene Sulfonat*) yang mempunyai sifat *biodegradable*. Deterjen banyak digunakan sebagai bahan pencuci atau pembersih dalam bentuk deterjen bubuk, deterjen krim, cairan pembersih lantai, pembersih kaca, pembersih kulit maupun pasta gigi, baik di rumah tangga, rumah sakit maupun di industri. Selama pembuangan limbah deterjen ini berakhir di sungai maka dengan sendirinya akan menyebabkan pencemaran lingkungan perairan, padahal air tersebut digunakan sebagai sumber air baku sebagian besar pengolahan air minum di Indonesia yang diolah untuk air minum. Sampai saat ini perusahaan pengolahan air minum masih berusaha terus untuk menghilangkan kandungan deterjen di dalam air minum tersebut (Laboratorium Teknik Penyehatan 1976; Didik TS, 1992). Akumulasi bahan baku deterjen tersebut (ABS dan LAS) yang bersifat toksis di dalam air sungai menyebabkan kandungan deterjen dalam air minum pun perlu diperhatikan, terlebih lagi pada musim kemarau. Air minum yang masih mengandung deterjen ini akan dikonsumsi tubuh per-oral dan dalam



waktu yang lama juga akan terakumulasi dan bisa berlaku sebagai *stressor*, sehingga diduga dapat mengganggu fungsi ketahanan mukosa usus.

Berbagai penelitian imunologis menunjukkan bahwa respon imun lokal lebih mencerminkan perubahan biologis yang terjadi di daerah yang mengalami jejas. Sistem imun mukosal merupakan pertahanan pertama terhadap imunogen atau patogen yang masuk tubuh per-oral, perubahan sistem imun lokal ini segera tampak ketika imunogen atau patogen tersebut melukai mukosa usus. Kerusakan lokal yang terjadi pada mukosa usus karena air yang terpapar ABS sangat dimungkinkan segera diikuti oleh kelainan sistemik, seperti yang telah ditemukan oleh peneliti terdahulu. Ditemukan efek toksik dan teratogenik pada embrio mencit (Murphy, 1972; Wilson, 1973; Mitruka, 1976 dan Purnomo, 1986), juga nekrosis sel hati (Ruth & Ross, 1977), nekrosis sel epitel tubulus ginjal (Thurau, Beylan dan Mason, 1979). Kerusakan epitel dari jaringan mukosa saluran pencernaan mencit (Artman, 1982), kerusakan insang ikan (Sastrawijaya, 1991). Gangguan pernafasan dan alergi pada marmut karena bahan pestisida dengan ABS yang disemprotkan ke dalam kandangnya (Ritz, 1993). Penelitian pada manusia meliputi kelainan lokal dengan terjadinya iritasi pada kulit dan mata (Sugai *et al*, 1990), peningkatan kekasaran kulit pada pemakai cairan pembersih kulit yang mengandung deterjen sintetis (Braun, 1992), prevalensi iritasi dermatitis kontak 44%, alergi dermatitis kontak 17% dan dermatitis atopik 15%, pada pekerja yang menggunakan cairan pembersih yang mengandung deterjen (Flyvholm, 1993). Selain itu Braun juga melaporkan tentang tertelannya pasta gigi yang mengandung surfaktan pada anak-anak 30 – 40 % dan dewasa 10 % setiap kali menggosok gigi. Berdasarkan kejadian tersebut dapat dipikirkan bahwa kulit sebagai lapisan pertahanan tubuh yang relatif kuat saja bisa

terkena gangguan dari bahan baku deterjen tersebut, apalagi mukosa usus yang relatif halus. Belum adanya laporan klinis terjadinya gangguan akibat deterjen bukan berarti tidak terjadi suatu kelainan didalam tubuh karena mungkin sebenarnya sudah ada kelainan morfofungsi dari komponen imunologis di mukosa usus. Sejauh ini perubahan morfofungsi sistem imun mukosal usus yang merugikan akibat bahan baku deterjen (ABS atau LAS) belum pernah diungkap.

Sistem imun mukosal merupakan sistem ketahanan imunologis yang melindungi tubuh dari patogen yang ada di makanan dan minuman. Bila sistem ketahanan imunologis ini rusak maka individu akan rentan terhadap berbagai patogen dan bahkan terhadap flora normal. Kondisi ini sangat merugikan kehidupan, dan bila hal ini terjadi pada manusia akan sangat menurunkan produktifitas manusia tersebut.

Di negara maju penelitian tentang paparan ABS tampaknya tidak banyak dilakukan karena di negara tersebut ABS sudah dilarang digunakan sebagai bahan baku deterjen. Namun di Indonesia tampaknya bahan tersebut masih banyak digunakan dalam pembuatan deterjen. Keterbatasan penelitian tentang ABS ini juga menyebabkan kesulitan untuk mendapatkan informasi perihal kemampuan ABS sebagai bahan imunogenik. Namun banyak dilaporkan bahwa ABS dapat menimbulkan berbagai perubahan pada sel sehingga ABS dapat disebut sebagai *stressor*. Atas hal tersebut maka dalam memecahkan masalah modulasi aktifitas sistem imun mukosal akibat paparan ABS tersebut perlu paradigma khusus, yaitu paradigma patobiologis yang berkonsep pada *stress cell*.

Sistem imun mukosal diketahui mengenal morfofungsi seperti halnya yang terdapat pada kelenjar getah bening (Putra, 1984) dalam sistem ini terdapat 2 daerah

fungsional yaitu daerah induktif dan daerah efektif mukosal (Hiroshi, 1994). Secara konseptual ABS dapat membuat sel M dan sel epitel mukosal mengalami stres sehingga sel ini menghasilkan *stress signaling substances*. Bahan tersebut akan mempengaruhi daerah induktif dan efektif mukosal. Model berfikir yang mendasarkan pada pencermatan modulasi sistem imun yang merugikan karena stres pada *immunocompetence cell* akibat paparan ABS diharapkan akan dapat mengungkap mekanisme modulasi aktifitas sistem imun mukosal yang merugikan tersebut.

Penelitian mengenai ABS yang sudah dilakukan oleh peneliti terdahulu sejauh ini belum pernah mengungkap pengaruh lokal di dalam tubuh akibat paparan ABS ini, sehingga peneliti ingin mengamati pengaruhnya pada penerima paparan pertama dari ABS yang masuk tubuh per-oral yaitu pada mukosa usus dengan menggunakan variabel dari komponen sistem imun yaitu sel T CD4, T CD8, NK, MØ, SP IgA, SP IgM dan SP IgG. Dengan harapan hasil yang dicapai bisa membantu mengatasi masalah sebelum kelainan sistemik/klinis terjadi.

Fungsi sistem imun mukosal yang penting adalah melindungi homeostasis sistem imun di mukosa, yang berarti mencegah terjadinya pemaparan imunogen lebih lanjut pada sistem imun sistemik. Berbeda dengan sistem imun sistemik, maka pada sistem imun mukosal terdapat berbagai daerah yang mempunyai fungsi tertentu, sehingga terjadi pemetaan sel imun berdasarkan fungsinya. ABS yang merupakan agen senobiotik yang toksik merupakan *stressor* yang dapat menyebabkan stres pada sel apitel mukosa dan sel M (*membranous cell / microfold cell*) mukosa usus. Kedua sel tersebut mempunyai peran pada sistem imun mukosal. Stres yang terjadi pada kedua sel tersebut akan memodulasi respons imun mukosal. Pada penelitian ini ABS/LAS sebagai *stressor*

akan memodulasi respons imun mukosal. Pada penelitian ini ABS/LAS sebagai *stressor* yang akan memodulasi sistem imun di mukosa usus mencit. Variabel yang ditetapkan atas dasar konsep sel yang mengalami stres tersebut akan diwujudkan dalam bentuk pola perubahan respons imun mukosal (PPRIM) yang dianalisis secara multivariat. Penafsiran bentuk PPRIM tersebut, diharapkan mampu untuk mengungkap mekanisme perubahan respons imun mukosal karena *stressor* yang berupa deterjen (ABS/LAS).

Penelitian ini menggunakan model berfikir yang berorientasi pada perubahan biologik yang merugikan tubuh sebagai akibat interaksi dengan lingkungan merupakan paradigma patobiologis (Putra, 1997), yang berkonsep pada *stress cell*.

Mengingat model kajian tersebut menitikberatkan pada konsep sel yang mengalami stres di mukosa, maka perubahan morfofungsi di mukosa yang diakibatkan oleh paparan ABS dalam deterjen per-oral merupakan sumber variabel yang akan digunakan untuk mendapatkan data untuk melakukan uji hipotesis. Berdasar pada konsep tersebut, suatu hipotesis akan dikembangkan dengan demikian maka pembuktian hipotesis atas uji tersebut akan dapat memecahkan masalah penelitian ini.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang masalah di atas, maka dibuat rumusan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Apakah paparan larutan Alkil Benzen Sulfonat (ABS/LAS) per-oral dapat menurunkan respons imun di mukosa usus mencit.

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengungkap mekanisme penurunan respons imun mukosa usus kecil akibat pemberian paparan ABS/LAS per-oral.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan adanya penurunan komponen sistem imun mukosa yaitu limfosit T CD4, limfosit T CD8, sel NK, sel MØ, SP IgA, SP IgM dan SP IgG akibat pemberian paparan ABS/LAS per-oral.
2. Mendapatkan pola penurunan respons imun mukosa usus kecil akibat paparan ABS/LAS per-oral.
3. Menjelaskan penurunan respons imun mukosa akibat paparan ABS/LAS per-oral berdasar pada pola yang terjadi.

1.4 Manfaat

1. Hasil penelitian ini dapat mengungkap mekanisme paparan ABS/LAS dalam deterjen per-oral, sehingga bisa memperkuat dilarangnya ABS sebagai bahan baku deterjen, karena ternyata ABS menekan Sp IgA sejak di area induktif sampai ke area efektif.
2. Mengingat paradigma patobiologis yang berkonsep *stress cell* telah dapat membuktikan modulasi aktifitas sistem imun maka diharapkan pengembangan paradigma psikoneuroimunologis di mukosal akan semakin pesat.
3. Hasil penelitian dapat menjadi peringatan akan bahaya ABS/LAS terhadap kesehatan, dan diharapkan dapat membantu usaha pencegahan intoksikasi

2. Mengingat paradigma patobiologis yang berkonsep *stress cell* telah dapat membuktikan modulasi aktifitas sistem imun maka diharapkan pengembangan paradigma psikoneuroimunologis di mukosal akan semakin pesat.
3. Hasil penelitian dapat menjadi peringatan akan bahaya ABS/LAS terhadap kesehatan, dan diharapkan dapat membantu usaha pencegahan intoksikasi ABS dalam deterjen serta membantu upaya mengatasi pencemaran lingkungan.

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Deterjen**

Sesungguhnya secara definitif deterjen adalah segala sesuatu yang digunakan sebagai bahan pembersih atau pencuci baik pakaian, alat rumah tangga maupun keperluan industri. Namun kalau definisi ini digunakan dikawatirkan masyarakat bisa kacau dengan istilah sabun yang terbuat dari lemak alami. Oleh karena itu dibuat kesepakatan umum bahwa yang dimaksud deterjen adalah suatu bahan yang dikemas dan diproduksi dengan maksud sebagai bahan pencuci pakaian dan alat rumah tangga sehari-hari, dapat teremulsi dalam air biasa dengan kandungan busa yang melimpah walaupun dalam air sadah (Malz, 1982). Bahan ini bekerja sempurna pada air dingin, toleran terhadap air sadah, mudah digunakan, dan secara ekonomis lebih murah harganya.

Ditinjau dari sifat kimia deterjen dan surfaktannya, deterjen adalah bahan pengemulsi (*emulsifier*) yang dapat berpenetrasi dan memisahkan lapisan minyak atau lemak kemudian bergabung dengan partikel kotoran, bertindak sebagai bahan pembasah (*Wetting agent*) untuk membantu menghanyutkannya (Parker, 1993). Bahan dasar deterjen yang berupa senyawa organik bersifat sebagai zat aktif permukaan dalam medium cair disebut surfaktan (Sawyer & Mac Carty, 1987). Dalam pengertian umum deterjen diartikan sebagai bahan pembersih yang terbuat dari campuran surfaktan, bahan

pembersih khusus, bahan pengharum, bahan pemutih atau pengkilat warna (Grayson, 1983).

Ditinjau dari segi fungsinya maka deterjen dan sabun alami tidak berbeda, karena keduanya berfungsi sebagai zat pencuci atau pembersih. Secara struktural deterjen dan sabun nyata sekali berbeda. Sabun umumnya dibuat dari garam natrium atau kalium dengan asam lemak alami seperti oleat, stearat, palmitat dan sebagainya, sedang deterjen berasal dari minyak bumi yaitu hidrokarbon parafin dan olefin (Sugiharto, 1987). Kekurangan sabun adalah, kecenderungan terjadinya endapan Ca dan Mg, dengan demikian menghapuskan aksi dari sabun, sehingga biasanya terlihat dengan terbentuknya "*bath tub ring*" (Braun – Falco, 1992).

Deterjen yang sekarang banyak dikenal dan sangat luas pemakaiannya adalah deterjen sintetik (sindet), sehingga kalau orang berbicara tentang masalah deterjen berarti yang dibicarakan adalah deterjen sintetik dengan bahan baku ABS. Sindet mempunyai sifat yang lebih unggul dibandingkan dengan deterjen alami atau sabun, karena tidak membentuk endapan dalam air sadah yaitu air yang banyak mengandung kalsium, magnesium, dan besi (Applequist, 1982). Oleh karena itu dalam air sadahpun hanya diperlukan sedikit deterjen saja sudah mampu membersihkan dibanding dengan pemakaian sabun.

Inti bahan pembentuk deterjen yang beredar di Indonesia adalah Alkil Benzen Sulfonat (ABS) atau Desil Benzen Sulfonat (DBS). Keduanya merupakan deterjen sintesis tipe keras (*hard ABS*), yaitu bahan pembentuk deterjen jenis anion, yang di berbagai negara maju sudah ditolak penggunaannya sehubungan dengan banyak dampak negatifnya. Menurut data statistik industri 1981 (BPS, 1981) tercatat ABS digunakan

sebagai bahan pembentuk 64,51 persen deterjen dan diedarkan sebagai bahan pencuci di berbagai kalangan masyarakat, sedang DBS digunakan sebagai bahan pembentuk 35,49 persen deterjen dan diedarkan dalam industri pembersih.

Surfaktan sebagai bahan aktif permukaan sangat penting dalam sindet ini karena memiliki sifat merendahkan tegangan permukaan air sehingga akan mempertinggi sifat *metting*, sekaligus berfungsi sebagai *emulsifier* (pengemulsi), flokulator koloid dan desinfektan. Disamping surfaktan deterjen masih mengandung bahan yang lain seperti polyphosphates (terutama sodium tripolyphosphates, NTA), sodium silicate dan sejenisnya sebagai zat pembangun, sodium sulphates untuk pelarut dan pencuci bersama dengan soda ash, carboxy methyl cellulose (CMC) untuk melarutkan tanah atau debu, bahan aditif (zat warna dan pewangi) serta coconut mono ethanol amine (CME) sebagai foam booster.

Berdasarkan jenis surfaktan, deterjen dapat digolongkan dalam tiga kelompok yaitu :

1. deterjen anionik jumlahnya sekitar 75 %
2. deterjen nonionik jumlahnya sekitar 20 %
3. deterjen kationik jumlahnya sekitar 5 % (Sawyer and Mc.Carty, 1978).

Ketiga surfaktan dari deterjen ini mengandung dua kutub molekul, yaitu molekul hidrofilik dan lipofilik. Molekul hidrofil memiliki afinitas yang tinggi dalam air, sedang molekul lipofil memiliki afinitas yang tinggi terhadap lemak dan minyak. Karena adanya dua kutub itulah maka deterjen dapat larut dalam air, lemak ataupun minyak dengan baik.

Deterjen anionik adalah senyawa yang bermuatan negatif, contohnya ABS atau LAS, deterjen anionik merupakan bahan yang sifat adsorsinya terhadap air terbaik daripada golongan yang lain sehingga dapat menembus pada bahan tekstil wol, katun, dan sutera, harganya dipasaran bebas relatif murah sehingga digunakan secara luas di masyarakat, baik untuk rumah tangga maupun industri. (Sawyer and MC Carty, 1978; Applequist, 1982).

Deterjen anionik dibedakan atas deterjen keras (*Hard ABS*) dan deterjen lunak (*Soft ABS*). Deterjen keras artinya deterjen tersebut tidak mengalami biodegradasi, sedangkan deterjen lunak adalah deterjen yang dapat mengalami biodegradasi (Applequist, 1982). Ketahanan deterjen keras terhadap biodegradasi disebabkan oleh surfaktannya berupa ABS (Alkil Benzen Sulfonat), sedangkan surfaktan deterjen lunak adalah LAS (Linier Alkil Bezen Sulfonat).

Deterjen non-ionik adalah senyawa yang tidak bermuatan atau netral, contohnya grup etilin oksida. Deterjen non-ionik dapat berpenetrasi pada tekstil golongan poli ester. Di pabrik berguna sebagai *water repelling* yang menghasilkan sedikit busa sehingga baik digunakan untuk pencucian otomatis (Grayson, 1983; Parker, 1984).

Deterjen kationik adalah senyawa yang bermuatan positif, merupakan bahan germisida dan pembersih logam yang mahal harganya (Grayson, 1983).

2.2 Alkil Benzen Sulfonat (ABS)

ABS rantai bercabang lebih disukai daripada ABS rantai lurus (LAS), karena disamping harganya lebih murah, mudah didapatkan, teremulsi dalam air, juga lebih

berbusa, baik di dalam air cucian maupun di dalam air sadah (Partoatmodjo, 1979 ; Sutamiharjo, 1983).

ABS mempunyai bentuk bangun kimia tetrapropylene, yaitu percabangan empat rantai karbon dari gugus dasar ABS di limbah deterjen yang mana ini sangat stabil, tidak mudah berubah dalam berbagai media, baik asam maupun basa, dan juga dalam kondisi panas maupun dingin. Senyawa ABS rantai bercabang ini dilaporkan tidak dapat didegradasi secara mikrobiologis (*nonbiodegradable*) (Atlas, 1990 ; Schlegel, 1992 ; Parker, 1993). Karena terdapat percabangan dengan gugus metil, strukturnya menjadi semakin stabil dan bersifat toksis (Morrison and Boyd, 1992).

Bahan baku deterjen tersebut dapat menurunkan tegangan permukaan cairan dan mengangkat benda yang melekat pada suatu bahan dan berbagai alat terutama karena lemak (Grayson , 1983 ; Bordeau and Treshow, 1987 ; Sawyer and Mac Carty, 1987 ; Parker, 1993).

Sebagai bahan pengemulsi deterjen dapat berpenetrasi dan memecah lapisan minyak kemudian mengikat partikel kotoran dan bertindak sebagai "bahan pembasah" (*wetting agent*) sehingga membantu menghanyutkan kotoran dengan cara menurunkan tegangan permukaan (Parker, 1993). ABS yang berada di sungai menyebabkan busa yang melimpah menutup permukaan sungai, sehingga menghalangi difusi O₂ dari udara ke dalam air, akibatnya oksigen yang terlarut (*Dissolve Oxygen/DO*) sangat kecil.

ABS sebagai bahan dasar pembentuk deterjen adalah senyawa organik yang memiliki sifat sebagai zat aktif permukaan dalam medium berair, sehingga disebut sebagai agen aktif permukaan atau surfaktan. Semua surfaktan mempunyai dua ujung yang berbeda sifatnya yaitu hidrofil yang sifatnya polar dan ujung hidrofob yang

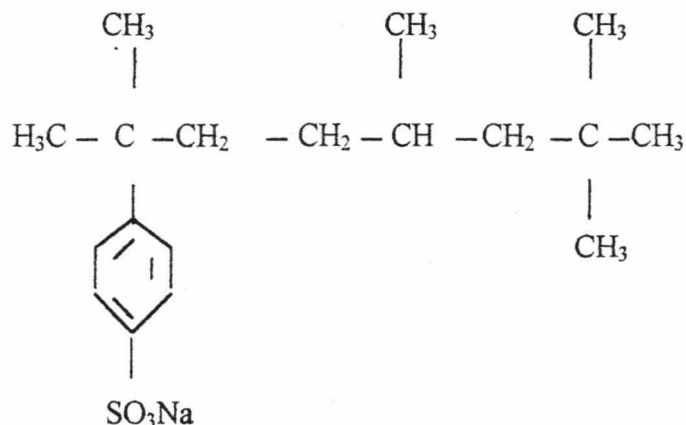


sifatnya non polar. Kelarutan dalam air biasanya disebabkan oleh adanya gugus karboksil, sulfat, hidroksil atau sulfonat. Surfaktan dengan gugus karboksilat, sulfat, dan sulfonat membentuk garam natrium atau kalium (Sawyer and McCarty, 1978). Surfaktan selain mampu menurunkan tegangan permukaan air, juga menurunkan tahanan terhadap perluasan permukaan air sehingga fase air lebih diperbesar (Ariens, 1986). Keadaan lain yang terjadi karena adanya surfaktan adalah meningkatnya kemampuan bercampur dengan air, merangsang terjadinya pengapungan zat padat bersama dengan busa pada permukaan air serta dapat menyebabkan kematian bakteri ataupun mikroorganisme air yang berguna (Parker, 1993).

Bila zat aktif permukaan dapat terpartisi dalam fase lipofil, misalnya pelarut organik seperti lemak atau minyak dan fase hidrofil, maka zat cenderung tertimbun diantara kedua fase dengan residu lipofil mengarah ke fase lemak dan residu hidrofil mengarah ke fase air. Pada konsentrasi yang cukup banyak dari zat aktif permukaan di dalam air, residu lipofil misalnya, rantai alifatik asam lemak saling tarik menarik membentuk agregat. Peristiwa ini disebut sebagai pembentukan misel (Ariens *et al*, 1986) Gugus hidrofil dalam peristiwa ini terdapat di sebelah luar dari misel sedang gugus hidrofob yang sulit larut dalam air dapat tertimbun dalam inti lipofil dari misel. Cara kerja membersihkan kotoran dari zat aktif permukaan deterjen berlandaskan pada prinsip yang sama.

Jenis ABS yang beredar di Indonesia adalah ABS tipe keras/*hard ABS* (Swisher, 1968). Salah satunya adalah Tetrapropylene Alkyl Benzene Sulfonate (TBS). Bentuk kimia TBS merupakan percabangan empat atom karbon pada gugus dasar ABS. Gugus tetrapropylene diperoleh dari pemisahan Olefin Tetrapropylene yang

disenyawakan dengan grup alkil, sehingga diperoleh bentuk rumus bangun sebagai berikut :



(Swisher, 1968)

Salah satu sifat TBS ialah struktur percabangan kurang rentan terhadap kerja bakteri alam. Bahkan bila penumpukan struktur percabangan TBS akan menyebabkan peningkatan daya tahannya terhadap bakteri maupun organisme lain. Akibatnya degradasi biologis TBS amat lambat, sehingga deterjen tipe keras ini dianggap relatif stabil dalam lingkungan perairan (Cain, Willet and Bird, 1971; Cabridenc, 1982). Tak bisa terdegradasinya ABS tipe keras ini menimbulkan bahaya akibat terakumulasinya di lingkungan terutama lingkungan perairan. Air dari lingkungan perairan yang tercemar ABS ini diambil sebagai bahan baku air minum.

2.2.1 Sifat dari ABS

Yang terpenting adalah sifatnya sebagai surfaktan sehingga mampu menurunkan tegangan permukaan cairan, dengan akibat berbagai komponen yang bersifat polar akan terlarut dalam air misal lapisan lemak dalam kotoran baju atau komponen "lipid bilayer" dalam membran sel mukosa.

Limbah deterjen stabil dan tidak mudah berubah dalam berbagai media baik asam, basa maupun panas dan dingin atau dengan kata lain bersifat *non biodegradable* sehingga tidak dapat didegradasi baik secara alami maupun buatan dengan bantuan manusia (*man made water purification*). Bahkan dengan adanya CME sebagai *foam booster*, menyebabkan surfaktan anionik ABS baik tipe keras maupun lunak lebih stabil dan lebih sulit diuraikan (Ariens, 1986). Bila dalam air sungai yang berfungsi sebagai bahan baku air minum ditemukan deterjen anionik (terutama yang mengandung zat aktif permukaan ABS) maka dapat diduga bahwa ABS akan tetap dapat ditemukan pula dalam air minum hasil pengolahan perusahaan air minum (lampiran 1.1 s/d 1.5). Limbah deterjen yang mengandung fosfat ini juga menambah dampak buruk bagi lingkungan perairan. Karena sebagai sumber fosfor perairan, bahan ini sebagai nutrisi bagi tumbuhan air, akibatnya terjadi *explosivitas* tanaman air/gulma air, sehingga mempercepat proses pendangkalan perairan, menurunkan nilai estetika air, mengganggu sanitasi air, menghambat penetrasi sinar matahari, menghalangi terjadinya difusi oksigen dari udara bebas ke perairan sehingga menurunkan kadar oksigen terlarut (*Dissolve Oxygen/DO*). Tumbuhan air yang mati, meningkatkan proses dekomposisi bakteri aerob sehingga BOD (*Biological Oxygen Demand*) meningkat. DO yang rendah dan BOD yang meningkat ini makin mempersulit proses biodegradasi dari deterjen (Cabridenc, 1982; Parker, 1993)

2.3 Linier Alkil Benzen Sulfonat (LAS)

Bentuk ini merupakan bentuk alternatif lain sebagai pengganti ABS dengan rantai karbon yang lurus, tidak mempunyai rantai cabang seperti ABS, lebih mudah terurai oleh bakteri.

Bentuk rumus kimia dari LAS sbb.:



SO₃ Na

L A S
Soft ABS

(Swisher, 1968)

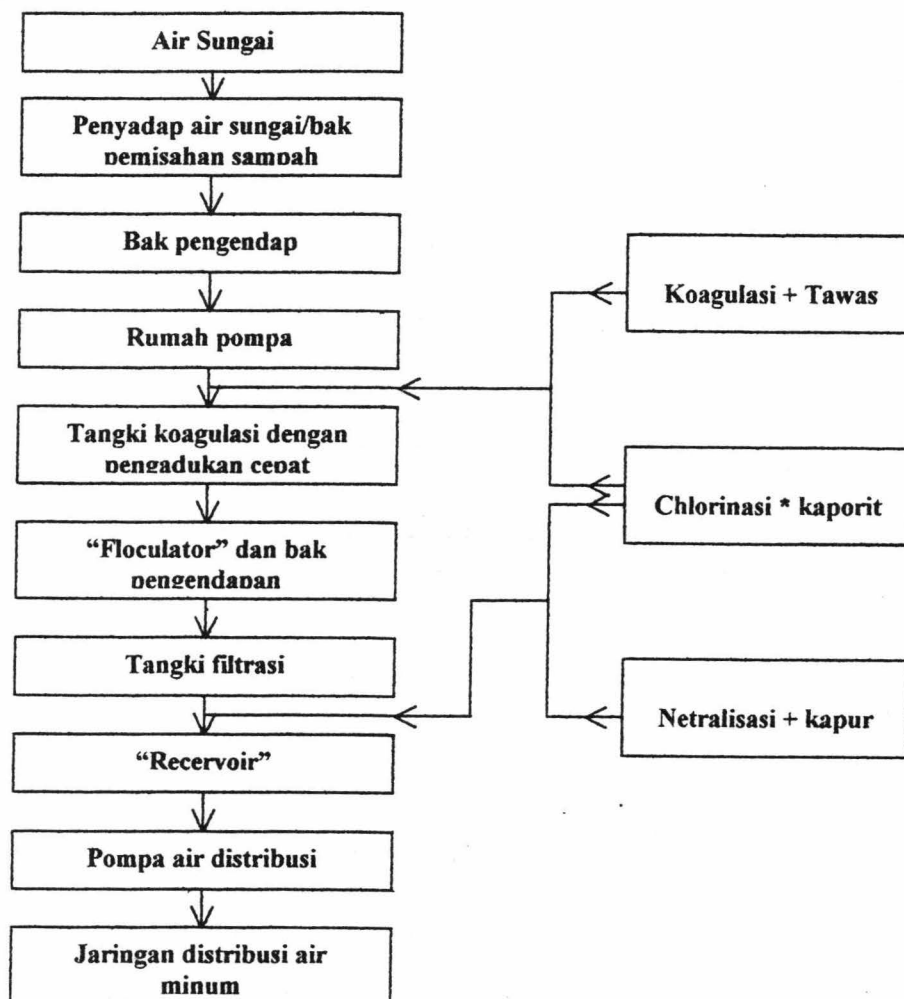
LAS, tidak menimbulkan busa banyak di perairan, tidak merespon terhadap Metylen Blue Analysis (Swisher, 1968). Degradasi biologis bagian akhir dari rantai lurus tersebut dilanjutkan dengan beta oksidasi dari rantai sehingga terjadi pelepasan 2 gugus karbon dan juga terjadi pemecahan lingkaran benzene. Degradasi LAS lengkap 80 – 90% dalam waktu 6 jam pada *Continuous flow activated sludge treatment*, dan pada *semi continuous flow*, 85 – 95 % terdegradasi dalam waktu 24 jam.

Perubahan penggunaan deterjen sintetis dari TBS menjadi LAS berpengaruh baik terhadap lingkungan perairan.

2.4 Air PDAM

Pada penelitian Didik (1992), telah didapatkan bahwa kandungan deterjen di sungai Surabaya 0,3319 ppm (0,3319 mg per liter air), dan dalam air minum kadarnya hampir sama dengan air bakunya, yaitu 0,210–0,310 ppm. Sedangkan data pada PDAM Kodya Surabaya Instalasi Penjernihan Ngagel 1995 dan Karang Pilang 1996 tercatat

bahwa kandungan deterjen air baku pada musim penghujan (bulan Oktober–Januari) berkisar antara 0,260-0,160 ppm dan pada musim kemarau (bulan April - Mei) berkisar antara 0,668-1,022 ppm. Kandungan deterjen hasil air olahan PDAM dari laboratorium instalansi penjernihan air minum Ngagel, berkisar antara 0,013-0,036 ppm. Harga kisaran kandungan deterjen air dalam olahan PDAM sangat luas yaitu dari 0,013-0,310 ppm. Sedang menurut peraturan NAB dari deterjen dalam air minum yang diperbolehkan adalah 0,05 ppm (lihat lampiran 1). Dibawah ini dicantumkan skema proses produksi air minum.



Gambar 1 : Skema proses produksi air minum pada Perusahaan Daerah Air Minum Ngagel Surabaya.

2.5 Kelainan yang terjadi akibat Sindet

2.5.1 Kelainan pada hewan akibat ABS

Artman (1982) melaporkan bahwa beberapa macam deterjen diduga menimbulkan kerusakan pada epitel jaringan mukosa mencit. Juga NTA (*builder*) sebagai komponen dari deterjen menyebabkan terjadinya teratogenik dan kematian pada embrio mencit (Artman, 1982). Pemberian larutan ABS pada induk mencit bunting mengakibatkan terjadinya kerusakan sel hati dan ginjal, sedang pada janin yang dikandungnya dapat mengakibatkan gangguan pertumbuhan, penurunan berat tubuh janin dan meningkatkan jumlah kematian janin mencit (Poernomo, 1984). Pada penyemprotan aerosol dengan bahan dasar deterjen pada kandang marmot, menyebabkan gangguan pernafasan dan alergi (Ritz , 1993). Perusakan struktur insang ikan terjadi pada pencemaran air dengan ABS 5 ppm (Sastrawijaya, 1991).

2.5.2 Kelainan pada hewan akibat LAS

Penelitian yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Toksikologi Industri di Lucnow, India terhadap marmut, hasil yang didapat menunjukkan bahwa LAS, Hexachlorohexane & LAS dicampur dengan hexachlorohexane berpengaruh secara bermakna terhadap enzim pada hati marmut, yakni dengan meningkatnya aktifitas β glucoronidase, aktifitas gamma glutamyl transpeptidase, enzim 5- nucleotidase dan enzim sorbital dehydrogenase (Mathur, 1992). LAS juga menyebabkan perubahan pada globulus lemak yang menyolok pada jaringan hati, pembesaran lobulus dan adanya bentukan Sinusoidal yang membesar (Mathur, 1992).

Begitu juga terhadap enzim pada ginjal marmut, ternyata berpengaruh secara bermakna, selain itu juga ditemukan berbagai kerusakan akibat LAS pada bagian kulit luar ginjal, kerusakan epitel pembuluh darah dan jaringan interstitial juga peradangan kronis di jaringan interstitial dan sekitar Kapsula Bowman. LAS berpengaruh langsung dengan absorpsi bahan kimia kedalam organ sasaran melalui lapisan luarnya. Perubahan yang terjadi pada enzim *B-glucoronidase* pada lisosom dan enzim *5-nucleotidase* pada membran sitoplasma merupakan tanda terdapatnya kelainan pada jaringan organ sasaran.

Adanya perubahan pada aktivitas enzim *gamma glutamyl transpeptidase*, yang mengkatalisis grup *T-glutamyl* peptida kepada peptida lain atau reseptor asam amino, menunjukkan adanya indikasi bahwa terjadinya kerusakan sel-sel parenkim hati dan ginjal disebabkan oleh bahan xenobiotik ini atau metabolitnya.

Aktivitas enzim sorbitol dehydrogenase dalam menjalankan proses reaksi oksidasi, reduksi, dan interkonversi *fructose dan sorbitol* juga terganggu. Terjadinya peningkatan peroksidasi lipid (*lipid peroksidation, LPO*) pada grup dengan pemberian LAS dan *hexachlorocyclohexane* menunjukkan bahwa bahan kimia tersebut membentuk radikal bebas yang bersifat toksik terhadap organ sasaran.

Bahan xenobiotik yang diberikan dalam bentuk tunggal merusak membran ikatan enzim (*membrane-bound enzymes*), tetapi jika digunakan secara bersamaan menyebabkan kerusakan jaringan, dan apabila LAS dan *hexachlorocyclohexane* digunakan secara bersamaan menyebabkan kerusakan yang lebih berat pada jaringan hati dan ginjal.

Para peneliti juga membuktikan kebenaran pernyataannya bahwa hasil penelitiannya sangat mendukung terjadinya kerusakan pada hati dan/atau ginjal bagi

para pekerja di industri dan/atau pertanian yang dipengaruhi langsung oleh bahan-bahan xenobiotik tersebut (Mathur , 1992).

Penelitian yang lain juga dilakukan terhadap ikan *Ictalurus sp* yang dimasukkan ke dalam akuarium berisi air minum (*tap water*) ditambah LAS dengan konsentrasi 3 ppm.

Pada pengamatan hari ke 3, aktivitas kehidupan *light cells* dan *dark cells* mulai terhenti, hari ke 6 sudah tampak adanya pembesaran pembuluh-pembuluh darah yang berarti, terjadi stasis, dan mulai terjadi respon peradangan (*inflammation*) yang bertipe pelebaran pembuluh darah, pembuluh darah stasis, dan peningkatan sirkulasi limfosit.

Setelah 9-12 hari, telah terjadi kerusakan lapisan epidermis yang bersifat germinatif dan tampak ada bekas pembesaran pembuluh darah. Dari 500 organ yang diamati terdapat 30 % yang telah rusak, hari ke 9-15 terjadi kerusakan ultrastruktur di bagian puncak dan seluruh epidermis organ sensitif (*barbel taste buds*), dan pada hari ke 15, 32 %, epidermis menjadi lebih tipis, dan morfologi organ perasa sensitif menjadi sangat sulit diamati (Zeni, 1992).

2.5.3 Kelainan pada manusia akibat deterjen

Sugai *et al*, 1990 melaporkan terjadinya iritasi pada kulit dan mata pada tukang cuci. Sedang gangguan yang sering terjadi pada pekerja pada pabrik wool dan serat sintetis adalah atopik intoleran dan alergi dermatitis akibat kontak. Deterjen yang digunakan sebagai pembersih di industri dan di rumah tangga juga menyebabkan iritasi dan alergi pada kulit akibat kontak langsung selanjutnya beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa bahan pencuci ada yang menyebabkan eksim.

Pengaruh pemakaian pasta gigi yang mengandung deterjen yang telah beredar luas dimasyarakat yaitu dengan Sodium lauryl sulfat suatu surfaktan anionik dilaporkan oleh Braun, 1992. Bahwa terjadi busa/"*Foaming action*" disini adalah hasil kerja dari surfaktan tersebut yang berfungsi menurunkan tegangan antar permukaan gigi sehingga membantu mendistribusikan bahan-bahan yang terkandung dalam pasta gigi ke sela-sela gigi yang tidak terjangkau sikat gigi. Tetapi disamping sifat tadi surfaktan tersebut mempunyai efek samping yang merugikan yaitu, merusak sel-sel darah merah di mukosa oral dan iritasi mukosa oral serta memudahkan terjadinya peradangan gingiva. Selain itu juga merusak rasa makanan yang dimakan segera setelah gosok gigi, yang biasa disebut *orange juice effect*. Penggunaan pasta gigi ini merupakan kegiatan harian yang berulang terus, pada hal orang dewasa biasa menelan 10 % pasta giginya secara tidak sadar, sedang pada anak-anak bisa menelan 30 – 40 %, apalagi jika pasta gigi tersebut mempunyai bau dan rasa yang enak akan lebih banyak lagi pasta gigi yang ditelannya. Sehingga perlu dipertimbangkan pengaruh sistemik dari surfaktan pada pasta gigi terhadap tubuh sehubungan dengan kegiatan menyikat gigi ini.

Selain itu pemakaian secara teratur cairan pembersih yang mengandung sindet yang banyak beredar dimasyarakat akan meningkatkan kekasaran kulit (Braun, 1992). Bahan preservatif dan bahan aktif permukaan (*surfaceactive agents*) merupakan penyebab utama terjadinya alergi akibat kontak. Bahan preservatif dan juga bahan aktif permukaan *iso thiazolinones*, *formaldehyde* dan *diethanolamide* terdafatar sebagai bahan penyebab alergi akibat kontak dengan bahan pembersih pada umumnya, pembersih kulit, pembersih rambut ("*hair shampoos*"), pembersih lantai ("*floor polishes*") (Flyholm, 1993).

Pada penelitian yang dilakukan terhadap pekerja di rumah sakit yang bekerja dengan menggunakan cairan pembersih yang mengandung deterjen menunjukkan bahwa prevalensi iritasi dermatitis karena kontak dapat mencapai 44 %, alergi dermatitis akibat kontak 17 % dan dermatitis atopik 15 % (Flyvholm, 1993).

Pada penelitian lain yang dilakukan terhadap pekerja pembersih pakaian lainnya menunjukkan bahwa di antara 1237 pekerja dilaporkan 12 % mengalami gejala kerusakan pada kulit, kemudian setelah beberapa bulan meningkat menjadi 30 %. Pada umumnya gejala kerusakan disebabkan karena kontak langsung dengan bahan pencuci bentuk basah (Flyvholm, 1993).

Jumlah keseluruhan bahan pembersih yang diteliti oleh *the Danish Product Register Data Base (PROBAS)* pada bulan Pebruari 1992 mencapai 5500 jenis, setengahnya terbukti menyebabkan alergi akibat kontak (Flyvholm, 1993).

Data dan keterangan tersebut di atas diperoleh dari luar negeri karena di dalam negeri belum ada data terinci mengenai terjadinya penyakit yang dapat digunakan sebagai bahan untuk mengantisipasi timbulnya akibat yang serupa di Indonesia apabila tidak ada usaha pencegahan penurunan kadar *ABS* dilingkungan, khususnya lingkungan perairan.

2.5.4 Toksikologi Benzen sebagai bahan pembentuk ABS.

Seperti telah diketahui pada pembuatan deterjen ABS sintetis, benzen merupakan salah satu bahan pembentuk deterjen ini, dimana hasil oligomerisasi propena direaksikan dengan benzen yang kemudian hasil reaksi tersebut digabungkan dengan gugus sulfonat dan ditambah natrium hidroksida akhirnya terbentuk ABS.

Banyak penelitian tentang benzen dilakukan akhir-akhir ini antara lain bahwa, benzen per-inhalasi menyebabkan immunosupresif dengan terjadinya penurunan jumlah total limfosit, penurunan T CD₄ dan penurunan rasio T CD₄/T CD₈ (Chung Hua , 1992), paparan benzen juga menyebabkan anemia aplastika dan leukemia (Zhu , 1995), metabolit benzen menyebabkan kerusakan DNA karena terjadinya senyawa oksigen reaktif dan berperan pula dalam mekanisme karsinogenesis (Shen , 1996; Sze , 1996). Selain itu juga terjadi penurunan retikulosit darah dan B limfosit pada sumsum tulang dan limpa (Farris , 1996), peningkatan apoptosis limfosit B Femoral dan limfosit T timus serta penurunan jumlah limfosit B limpa (Farris , 1997). Pada kultur sel mamalia metabolit dari benzen mampu menyebabkan transformasi sel, mutasi gen dan penyimpangan kromosom (Tsutsui , 1997), benzen juga bersifat karsinogenik dan toksik hematopoitik yang berbeda menurut umur dan jenis kelamin pada mencit, perbedaan ini karena kepekaan dari sel target yang tidak sama (Corti, Snyder, 1998).

Sehingga mungkin perlu diperhitungkan juga kontribusi pengaruh toksitas benzen dalam ABS berkaitan dengan kerusakan respons imun dari mukosa usus mencit.

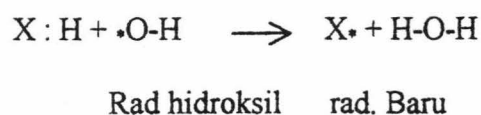
2.6 Oksidan dan Radikal Bebas

Oksidan dan radikal bebas berperan penting dalam peristiwa biokimia dan biologis dalam tubuh manusia, sehingga nyata terlibat dalam berbagai patogenesis penyakit dan proses menua. Dan keduanya sering dibaurkan oleh karena memiliki sifat-sifat yang mirip, hanya secara kimianya berbeda. Aktifitas oksidan dan radikal bebas sering menghasilkan akibat yang sama, walaupun prosesnya berbeda.



Oksidan adalah senyawa penerima elektron yaitu senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron, misal : $\text{Fe}^{+++} + e^- \longrightarrow \text{Fe}^{++}$

Sedang Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan (unpaired electron) dimana elektron ini cenderung untuk membentuk pasangan yaitu dengan menarik elektron dari senyawa lain (radikal bebas adalah penerima elektron), sehingga terbentuk radikal baru.



Radikal bebas memiliki 2 sifat :

- 1). reaktivitas yang tinggi, karena kecenderungannya untuk menarik elektron.
- 2). dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal yaitu membentuk radikal bebas baru sehingga terjadi reaksi rantai (chain reaction).

Jadi radikal bebas adalah oksidan, tetapi tidak setiap oksidan adalah radikal bebas. (Fridovich, 1978; Halliwell, 1991) .

2.6.1 Macam dan asal pembentukan radikal bebas

a. Radikal bebas di dalam tubuh

O_2 merupakan diradikal yang stabil, oleh karena itu O_2 merupakan pereaksi radikal bebas yang selektif. Melalui sistem enzim, dalam tubuh O_2 berubah menjadi "ROS" (*Reactive Oxygen Species*).

Species oksigen ini a.l :

1. Superoksid (O_2^*) merupakan spesies hasil penambahan 1 elektron pada O_2 . Diproduksi dalam tubuh melalui proses enzimatik maupun non enzimatik pada proses biokimiawi /fisiologis tubuh. Superoksid bisa mengalami reaksi dismutasi menjadi H_2O_2 .
2. Hidrogen peroksida (H_2O_2), ini bukan suatu radikal bebas, tetapi dapat mengawali terbentuknya radikal bebas. Banyak diproduksi di mitochondria & endoplasmik retikulum. Konsentrasinya meningkat jika konsentrasi oksigen meningkat. Uniknya H_2O_2 ini mampu menembus membran sel, sehingga bila proteksi di luar sel menurun, dengan adanya *transition metal* (Fe^{++}) maka akan terbentuk radikal hidroksil (OH^*).
3. Radikal hidroksil (OH^*), spesies ini sangat reaktif sehingga hampir semua molecul di dalam tubuh dapat dirusak.

b. Radikal Bebas dari luar tubuh

Asap rokok, asap kendaraan, ozone, NO, dll. (Cochrane, 1991; Halliwell, 1991; Sies, 1991).

2.6.2 Dampak negatif Senyawa Oksigen Reaktif atau "ROS"

Senyawa oksigen reaktif yang paling berbahaya adalah radikal hidroksil yang dapat merusak 3 jenis senyawa penting untuk mempertahankan integritas sel, yaitu : asam lemak, DNA dan protein membran sel.

1. Dampak Negatif terhadap Membran Sel

Komponen terpenting membran sel adalah : fosfolipid, glikolipid, dan kolesterol. Fosfolipid dan glikolipid mengandung asam lemak tidak jenuh (PUFA), yang rawan terhadap serangan radikal terutama radikal hidroksil. Dimana radikal ini dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid.



As.lemak rad. lipid



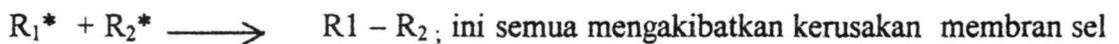
Rad. peroksi lipid.



dst.

Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terpecahnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang toksis terhadap sel, a.l. aldehid serta berbagai hidrokarbon seperti etana (C_2H_6) dan pentana (C_5H_{12}).

Atau dapat terjadi ikatan silang antara 2 rantai asam lemak, antara asam lemak & rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi antara 2 radikal :



yang parah sehingga membahayakan kehidupan sel.

2. Dampak Negatif terhadap DNA

DNA, merupakan perangkat genetik sel, disini terjadi hidroksilasi basa timin, sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin, serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tidak parah maka bisa diperbaiki dengan DNA *repair system*, tetapi ini

sering menimbulkan mutasi oleh karena perbaikan sistem DNA cenderung membuat kesalahan yaitu bila mutasi kena gen-gen tertentu yang disebut proto-onkogen akan menimbulkan kanker. Bila kerusakan DNA parah maka tidak bisa diperbaiki sehingga replikasi sel terganggu.

3. Dampak Negatif Terhadap Protein

Protein memegang berbagai peran penting seperti enzim, reseptor, antibodi dan pembentuk matrix serta sito skeleton. Oksidan merusak protein oleh karena dapat mengadakan reaksi dengan asam-asam amino yang menyusun protein. Yang paling rawan adalah sistein, yang mengandung gugusan sulfhidril (SH), ini paling peka terhadap serangan radikal bebas seperti radikal hidroksil.



Pembentukan ikatan disulfida (-S-S-) menimbulkan ikatan intra/antar molekul protein sehingga protein tersebut kehilangan fungsi biologisnya, misal enzim menjadi kehilangan aktifitasnya. (Murray, 1990; Sies, 1991).

2.7 Cara kerja ABS di dalam tubuh

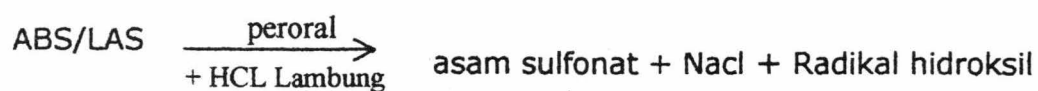
Surfaktan anionik dari deterjen ini mengandung dua kutub molekul, yaitu molekul lipofilik dan hidrofilik (polar & non polar). Oleh sebab itu, maka deterjen dapat larut dalam air, lemak, ataupun minyak dengan baik. Hal ini memungkinkan deterjen dapat melewati membran sel mukosa usus yang berstruktur dasar lipid dengan sedikit protein di kedua permukaannya, dengan cara melarutkan membran lipid tersebut, sehingga ABS

ini mungkin mempengaruhi morfologi dari berbagai elemen limfoid di jaringan mukosa.

Kecuali itu banyak jenis stres lingkungan termasuk senyawa kimia tertentu yang dapat merangsang meningkatkan jumlah radikal bebas di dalam sel (Mc. Gregor, 1992). ABS sebagai bahan toksik masuk tubuh peroral, juga akan menyebabkan kerusakan membran sel karena terbentuknya radikal bebas yang sangat reaktif, mungkin diawali dengan pembentukan radikal sulfonat yang diikuti dengan radikal yang lain. Radikal bebas ini akan mengganggu *immunocompetence cell*, sehingga akan menurunkan kualitas sistem imun mukosal, akibatnya akan memodulasi respons imun yang terjadi. Jadi jelas masuknya ABS yang bersifat toksik sebagai bahan baku deterjen peroral secara tidak sengaja dan bersifat kronis sebagai *stressor*, akan merusak sel epitel & sel M sebagai *stress cell* pada mukosa saluran pencernaan, dengan akibat terganggunya sel imunokompeten yang berakhir dengan penurunan respons imun mukosal.

2.7.1 Reaksi kimia pembentukan radikal bebas yang terjadi pada ABS.

ABS/LAS yang masuk tubuh per-oral, didalam lambung dapat lebih dahulu bereaksi dengan HCL lambung sehingga dapat terjadi reaksi sebagai berikut :



kemudian akan terjadi :

1. Radikal sulfonat, yang segera mengalami fragmentasi menjadi radikal aril/radikal turunan benzen.

2. Radikal asam sulfonat, yang kemudian bisa berubah menjadi radikal oksigen dari turunan aril yang bila bertemu dengan radikal alkil yang lain akan menjadi alkohol, radikal hidroksil & radikal etil. (Norman, 1968; Pine, 1981; Sykes, 1981).

Radikal bebas yang terjadi ini akan merusak membran sel, merusak DNA dan replikasi sel serta merusak fungsi biologis protein.

2.7.2 Stres pada individu sel

Studi tentang respons organisme terhadap stres khususnya panas telah dimulai sejak awal abad kedelapan belas melalui penelitian dengan menggunakan larva *Drosophila melanogaster*. Pada tahun 1962 Ritossa melaporkan bahwa pada kromosom yang diambil dari kelenjar ludah *Drosophila melanogaster* yang diberi panas ditemukan adanya pengkabutan. Kemudian tahun 1974 Tissieres dan Mitchell menemukan bahwa pengkabutan ini adalah protein yang disintesis sebagai akibat adanya peningkatan aktivitas gen. Pada waktu itu hanya terjadi peningkatan sintesa protein bila sel dikenai panas sehingga protein ini disebut sebagai *heat shock protein* (HSP).

HSP adalah protein yang disintesis oleh setiap sel baik eukariot maupun prokariot dalam keadaan basal maupun dalam keadaan stres. Tidak semua perlakuan supra optimal dapat menginduksi sintesis HSP. Pada umumnya induksi HSP paling menonjol terjadi apabila temperatur dinaikkan secara bertahap sampai batas toleransi sel atau organisme (Nover, 1984). Pada sel normal produksi HSP melalui pemanasan secara bertahap ini diduga berkaitan erat dengan meningkatnya daya toleransi sel terhadap kondisi stres di lingkungan ekstrem (*Heat Tolerance*).

Respons HS ini dipercaya merupakan mekanisme perlindungan untuk menjamin kelangsungan hidup sel selama periode stres. Ternyata HSP tidak hanya muncul karena induksi temperatur tinggi, tetapi juga muncul pada hampir semua kondisi stres fisiologis yang tidak menguntungkan bagi sistem kehidupan eukariota, seperti kondisi anaerob, kekurangan nutrisi, keberadaan berbagai senyawa asing, logam berat, infeksi virus dan radikal bebas (Nover, 1984 ; Nemer,1985 ; Mc Gregor, 1992).

Hampir semua sel memberikan respons yang serupa terhadap stres panas, khususnya dari kelas HSP-28. Sedang HSP-70, terbukti ada dalam serum darah tikus dan mencit setelah mengalami stress (menerima *stressor*) (Sumitro, 1993). HSP-70 selalu ada pada setiap sel, bila sel tersebut menerima stress. Hampir tidak pernah ditemukan bila sel dalam keadaan normal. Jadi ada kemungkinan peranan sistemik HSP dalam mengkoordinasikan seluruh sistem tubuh melawan akibat dari kondisi stres.

Pada kondisi fisiologis normal, HSP ternyata berfungsi sebagai chaperon yang terlibat dalam pencegahan kesalahan transkripsi maupun replikasi DNA, pemeliharaan protein inaktif, serta pengaturan proses degradasi protein (Mc Gregor, 1992). Namun mereka akan disintesis dalam jumlah besar apabila sel mengalami tekanan lingkungan yang merusak sistem sel.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa ekspresi gen HS juga dapat diinduksi dengan pemberian zat karsinogenik (Carr, 1986) dan pada waktu sel hati menerima infeksi virus hepatitis B (Ciocca, 1991).

Dalam keadaan stres HSP menjaga homeostasis intraseluler dengan cara memperbaiki protein yang mengalami misfolding, translokasi protein, dan degradasi protein yang tak dapat diperbaiki lagi dan mencegah terjadinya interaksi protein yang

abnormal (Mc Gregor, 1992, Heufelder, 1991). HSP merupakan pertanda awal dari sel yang mengalami diferensiasi maligna, HSP inilah yang dikenali oleh TNF. Makin dini HSP ini diekskresi makin dini pula TNF diaktifkan sehingga pertumbuhan tumor semakin terhambat (Tamura, 1993).

Selain itu diduga HSP juga berperan dalam proses imun dan otoimun. Peran HSP dalam proses imunologis yaitu : (1). HSP dapat merupakan ligand dari γ dan δ TCR, (2). Peptida HSP dalam bentuk kompleks dengan MHC I dapat dipresentasikan pada sel T yang sesuai, dan (3). HSP dapat berfungsi sebagai presenting molekul dari peptida endogen yang berasal dari sel. Dalam hal ini, HSP dapat berfungsi analog dengan MHC I meskipun populasi sel T yang terkait berbeda dengan sel T dari MHC I.

Secara umum jenis kondisi yang mampu menginduksi ekspresi gen HSP dapat digolongkan menjadi 3 (Kroeger & Morimoto, 1995) yaitu (1). Stres lingkungan (panas, bahan kimia, toksis, dll.), (2). Stres fisiologis (kondisi sakit), dan (3). Kondisi normal/non stres (siklus sel, growth factor, perkembangan organisme). Pada kondisi normal atau non stres umumnya HSP berperanan sebagai chaperon.

Dugaan keterkaitan antara HSP dengan penyakit otoimun didasarkan pada kenyataan ditemukannya antibodi melawan HSP penderita berbagai penyakit autoimun. Bila terjadi infeksi, sel akan mengekspresikan HSP, yang ternyata sering dikenali oleh antibodi dan sel T. Hal ini diduga yang menjadi dasar kejadian otoimun (Douglas, 1992).

Penelitian mengenai stres terhadap sistem imunitas tubuh ternyata di dapatkan bahwa :

Stres menyebabkan penekanan sistem imunitas tubuh sesuai dengan intensitas stressor (Keller, 1981). Stres juga menyebabkan penekanan terhadap stimulasi limfosit walaupun setelah dilakukan pengambilan kelenjar adrenalnya (Keller, 1983), dan menyebabkan pengurangan jumlah limfosit dan splenosit, aktifitas NK, penurunan ekspresi Ia antigen dalam merespons gama IFN, serta meningkatnya PGE₂. Pada awal respons terhadap stres, terjadi perubahan fungsi dari sel dalam sistem imun terutama makrofag dan disregulasi makrofag memberikan kontribusi terhadap penekanan respons imun secara umum (Cheng, 1990). Pada stimulasi dengan stres dingin secara kronis menyebabkan peningkatan ACTH, kortikosteron, T₃ dan T₄ (Goundasheva, 1994), dan modifikasi dari konsentrasi imunosit β endorfin dan respons imun karena stres serta IL-1 tidak dipengaruhi oleh indometasin, adrenalectomi ataupun hipofisektomi. Jadi respons imun pada stres tidak secara spesial berhubungan dengan aktivasi dari HPA aksis (Panerai, 1997). Interleukin 1 memodulasi respons imunologik maupun endokrinologik terhadap stres dan berperan pada reaksi fisiologis kritis terhadap stres (Rybakina, 1997), selain itu stres berhubungan erat dengan peningkatan ekspresi IL-1 beta, TNF alfa serta pengurangan ekspresi IL-2, IFN gama, molekul MHC II serta penurunan aktifitas sel NK/NKA (Holden, 1998). Tidak konsistensinya sirkulasi subset limfosit dan terjadinya peningkatan sirkulasi sel NK didapatkan pada kondisi depresi (Ravindran, 1998).

ABS sebagai *stressor* sedang sel M dan sel epitel sebagai *stress cell* yang mengalami stres akan menghasilkan *stress signaling substances* yang akan mempengaruhi respons imun mukosal. Selain terjadi peningkatan ekspresi IL-1 yang akan memodulasi respons imun, juga terjadi peningkatan TNF α . Peningkatan secara

kronis dari TNF α ini akan menghambat enzim *protein tyrosine phosphatase* (PTP ase) yang bekerja mengawali aktivasi dari MHC I akibatnya terjadi penurunan ekspresi dari MHC I antigen pada permukaan sel, sehingga sel akan kehilangan sifat *immune surveillance* nya (Oppenheim, 1986). Pada kondisi stres juga terjadi penurunan ekspresi IL-2, sehingga proliferasi dan diferensiasi sel T menurun serta penurunan IFN γ yang berakibat terjadinya penurunan fungsi makrofag, aktifitas sel NK dan penurunan ekspresi MHC I dan MHC II (Holden, 1998).

2.8 Sistem Imun Mencit

Digunakannya mencit sebagai hewan percobaan karena 60 – 80 % hewan percobaan untuk uji biologik menggunakan mencit, dengan alasan :

1. tubuh kecil, sehingga tidak banyak memerlukan ruang pemeliharaan dan konsumsi makanan.
2. Mudah beradaptasi dengan kandang dan lingkungan sekitar.
3. Harganya murah.
4. Sistem imun lebih banyak diketahui dibandingkan dengan hewan percobaan lain (Hudson & Frank, 1976).

Sejak 1966 Claman dan kawan-kawan menemukan konsep seluler untuk membedakan subset/sub klas dari sel T pada mencit, maka selanjutnya mencit digunakan sebagai model untuk meneliti secara rinci sistem imun seluler (Clark, 1983).

2.9 Sistem Imun Tubuh

Untuk melaksanakan sistim imun di dalam tubuh terdapat suatu sistem yang disebut sistem limforetikular. Sistem ini merupakan jaringan atau kumpulan sel yang letaknya tersebar di seluruh tubuh, saluran cerna dan berbagai organ lain. Jaringan ini terdiri atas bermacam-macam sel yang menunjukkan respons terhadap suatu rangsangan sesuai dengan sifat dan fungsi masing-masing.

Sistem imun mempunyai 3 fungsi utama, yaitu :

1. Pertahanan (proteksi), ditujukan terhadap antigen dari luar
2. Homeostasis, terjadi proses degradasi dan katabolisme yang bersifat normal agar komponen yang sudah tua, maupun rusak dapat dieliminasi dari dalam tubuh
3. Perondaan (*immune surveillance*) dikerjakan diseluruh tubuh dengan maksud untuk mengetahui, memantau dan mengenal sel tubuh menjadi abnormal melalui mutasi sel (Stites, 1991; Goodman, 1991).

Rangsangan terhadap sel-sel tersebut terjadi apabila ke dalam tubuh masuk suatu zat yang oleh sel atau jaringan tadi dianggap asing, yang disebut antigen. Jaringan tersebut yang disebut sistem imun, dapat membedakan zat asing (*non-self*) dari zat yang berasal dari tubuh sendiri (*self*).

2.9.1 Respons Imun

Tubuh mempunyai dua macam ketahanan tubuh yaitu : ketahanan tubuh alamiah (*natural / innate immunity*) dan ketahanan tubuh didapat (*adaptive / aquired immunity*).

a. Ketahanan tubuh alamiah

Ketahanan ini dimiliki sejak lahir, suatu respons imun yang melibatkan sejumlah elemen non spesifik yaitu, kulit, membrana mukosa, makrofag, PMN, eosinophil dan sel NK. Ketahanan tubuh ini biasanya terdapat pada permukaan tubuh yang berhadapan langsung dengan lingkungan luar tubuh, jadi sebagai garis pertahanan pertama, melawan imunogen. Sifatnya tidak spesifik, sebab tidak bisa membedakan antara *self* dan *non self*, serta tidak mempunyai daya memori.

b. Ketahanan tubuh adaptif

Diperoleh setelah individu bersentuhan dengan imunogen, berfungsi memperkuat ketahanan tubuh alamiah. Ketahanan ini bersifat spesifik dapat membedakan *self* dan *non self* serta mempunyai daya memori. Selain itu juga melibatkan sel-sel imunologik yaitu interaksi dari : makrofag, limfosit T dan limfosit B, imunoglobulin, limfokin dan sitokin (Roitt, 1990; Goodman, 1991).

Reaksi tubuh yang kompleks yang dibangkitkan oleh masuknya antigen/bahan asing disebut : Respons Imun (Goodman, 1991). Sifat khas dari respons imun ini adalah spesifik, memori dan amplifikasi. Spesifik artinya mempunyai sifat bereaksi dengan imunogen tertentu, memori artinya mampu mengingat / mengenal imunogen yang pernah kontak, dan amplifikasi berarti mampu memperkuat respons imun yang telah ada (Roitt, 1990).

Limfosit dan fagosit mononuklear adalah sel-sel yang mempunyai peranan sentral dalam respons imun. Keduanya berinteraksi dan dapat memberikan respons imun.

Monosit dalam darah bila dirangsang akan berdiferensiasi menjadi makrofag didalam jaringan. Sedang limfosit yang bekerja dalam sistem imun adalah dari jenis limfosit kecil. Limfosit ini berdasarkan fungsinya diklasifikasikan menjadi tiga kelompok yaitu :

Limfosit T, limfosit B dan limfosit T sitotoksik atau *natural killer cell* (sel NK).

2.9.2 Komponen Sel Pada Respons Imun

Berdasarkan jenis sel yang terlibat didalamnya, maka respon imun dibagi menjadi 3, yaitu :

1. Respons imun seluler

Berupa proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T menjadi sub-populasi sel T seperti T-helper, T sitotoksik / T supresor dengan fungsi imunologiknya masing-masing.

2. Respons imun humoral

Berupa proliferasi dan perubahan populasi sel B menjadi sel plasma yang dapat mensekresi antibodi kedalam sirkulasi. Antibodi akan berikatan dengan antigen yang masuk untuk membentuk kompleks yang meng-aktifasi komplemen, dengan akibat penghancuran dari kompleks tersebut.

3. Interaksi antara respons imunologik seluler dan humoral

Limfosit T yang teraktifasi oleh antigen akan menyebabkan sel T berdiferensiasi menjadi sel T helper & sel T sitotoksik / T supresor. Kemudian sel T helper berdiferensiasi menjadi Th 1 dan Th 2. Sedangkan sekresi sel Th 1 yaitu IL-2 akan merangsang sel makrofag (respon imun

seluler), dan sekresi sel Th 2 yaitu IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-6 akan merangsang sel B menjadi sel plasma yang membentuk antibodi (respon imun humoral) (Abbas, 1991; Sigal, 1994).

2.10 Faktor Perubah Mekanisme Imun

Terdapat sejumlah faktor yang dapat mempengaruhi mekanisme imun, antara lain :

1. Faktor Metabolik

Hormon tertentu dapat mempengaruhi respons imun tubuh, misal pada keadaan hipoadrenal dan hipotiroidisme ataupun pengobatan dengan steroid akan menyebabkan menurunnya daya tahan terhadap infeksi.

2. Faktor Lingkungan

Lingkungan yang miskin, secara tidak langsung juga akan menyebabkan penurunan daya tahan terhadap in-feksi.

3. Faktor Gizi

Kekurangan gizi merupakan penyebab utama timbulnya imunodefisiensi

4. Faktor Anatomi

Adanya kerusakan pada permukaan kulit atau selaput mukosa sebagai garis pertahanan pertama terhadap agent, akan menurunkan daya tahan terhadap infeksi.

5. Faktor Fisiologik

Zat yang termasuk dalam imunitas alamiah seperti getah lambung, zat bakterisida kulit, interferon dan sebagainya akan meningkatkan daya tahan tubuh.

6. Faktor Umur

Fungsi sistem imun pada umur lanjut, umumnya akan menurun di banding dengan orang yang lebih muda, ini disebabkan pengaruh kemunduran biologik secara umum akan mengakibatkan perubahan respons imun humoral dan seluler.

(Silverstain, 1989).

2.11 Sistem Imun Mukosal Usus

Sistem imun dalam saluran pencernaan mempunyai peran penting dalam ketahanan tubuh terhadap bakteri, virus, dan parasit serta interaksi tubuh dengan lingkungan imunogen. Saluran pencernaan terdiri atas banyak jaringan limfoid dan kira-kira 80 % dari semua imunoglobulin yang diproduksi dalam tubuh dihasilkan oleh mukosa saluran pencernaan.

Respons imun mukosal dilakukan oleh limfosit, yang terdiri atas sistem limfosit yang masak bersama-sama sel pelengkap/sel asesori yaitu makrofag, sel dendrit, dan tipe lain dari sel penyaji antigen (*APC/Antigen Presenting Cell*). Sel asesori diperlukan untuk maturasi dan fungsi efektor dari sel limfosit.

Pengenalan terhadap antigen, mengawali proliferasi dan deferensiasi sel limfosit yang penting untuk pembangkitan dari sel efektor dan sel memori.

Lingkungan internal dari mamalia kontak dengan lingkungan luar melalui kulit dan membran mukosa. Dibandingkan dengan kulit, membran mukosa merupakan mekanisme pertahanan yang lemah, tetapi mereka menyediakan pertahanan yang luas / *extensive* yang terdiri atas imunitas spesifik dan non spesifik.

Sistem imunitas mukosal usus merupakan hasil evaluasi pengaruh susunan imunogen utama yang kompleks yang terdapat didaerah mukosa dan mungkin berbeda coraknya dari sistem imun sistemik yang meliputi :

1. Suatu Immunoglobulin yang berhubungan dengan mukosa, yaitu IgA;
2. Adanya komponen yang terdiri dari sel T yang mempunyai kemampuan mengatur (regulatory) atau bertindak (effector) ;
3. Sistem lalu lintas sel yang berorientasi mukosa yang pada awalnya di munculkan di folikel mukosa untuk kemudian mengadakan migrasi ke jaringan limfoid yang tersebar dibawah epitel. Corak yang terakhir ini merupakan gambaran pemisahan antara sel mukosa dari sel sistemik , jadi tampaknya sistem imun mukosa sedikit banyak merupakan kesatuan imunologik tersendiri (Stites,1991).

Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT), terdiri atas kumpulan (agregasi) limfosit yang ditemukan dalam lamina propria dan sub-mukosa beberapa membran mukosa dari traktus gastrointestinalis, respiratorius dan urogenitalis. MALT ini sangat berperan dalam induksi respons Ig A mukosal. Keistimewaan dari MALT adalah posisinya yang terpisah dari organ limfoid sistemik. Limfosit disini terutama akan berfungsi didalam sistem limfoid mukosa asal, walaupun mungkin sempat keluar ke sirkulasi darah, namun akan kembali ke mukosa yang telah membuatnya jadi aktif.

Gambaran dari *MALT* di usus yang biasanya disebut *GALT* yang penting adalah adanya sejumlah limfosit soliter intra epitelial (*Intra Epithelial Lymphocytes – IELs*). *IELs* ini sebagian besar adalah turunan dari sel T.

Sirkulasi dan homing dari limfosit ditentukan dan diatur oleh kemampuan mereka berinteraksi dengan sel endothel, yang terjadi mula-mula dengan endothel dari *High Endothelial Venules-HEV* (Strober, 1994).

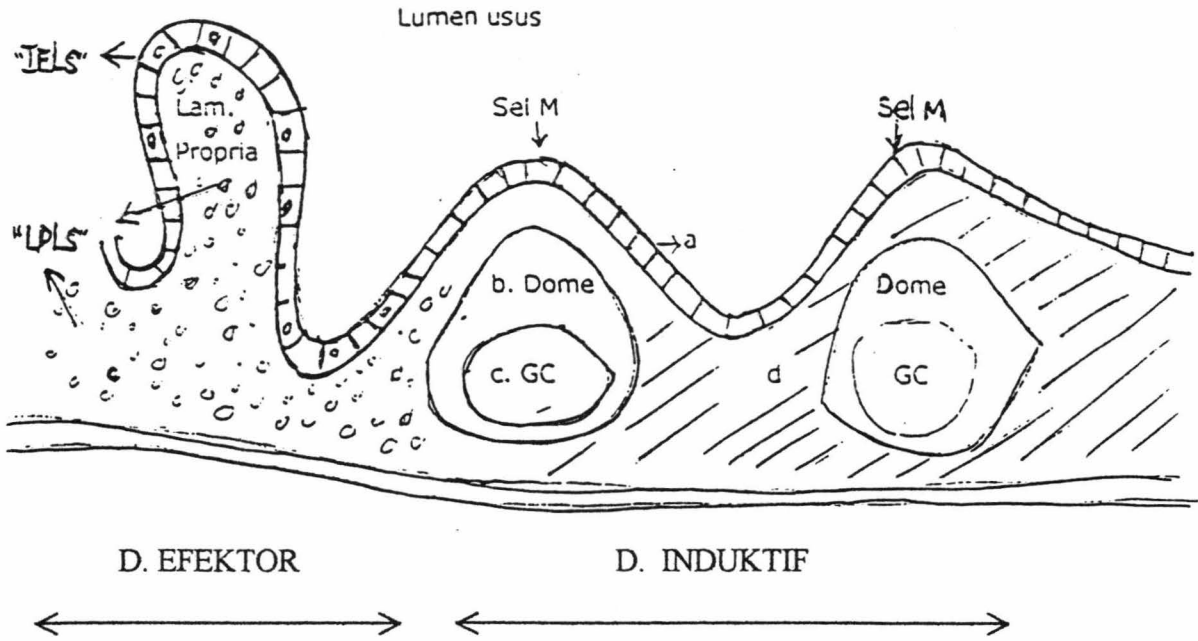
Sistem imun mukosal oleh Stites (1994) secara anatomi dan morfologik dibagi 2 bagian yang utama :

1. Jaringan limfoid yang terorganisasi yang mengandung folikel mukosa seperti *Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT)*, dan *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT)*, dimana keduanya termasuk dalam *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT)*.
2. Jaringan limfoid difus yang tersebar luas di dalam lamina propria mukosa (Stites, 1994).

Pada usus, *GALT* ini berupa sebagai *Plaques Peyer* (*Peyer's Patches/PP*), yang terdiri atas M sel (*Microfold cells*), area Dome, area sel B dan area sel T, merupakan daerah jaringan limfoid yang bersifat "aferen". Imunogen masuk kedalam sistem dan merangsang timbulnya respons imun. Sedang jaringan limfoid difus yaitu limfosit lamina propria (*LPLs*) dan limfosit intra epitel (*IELs*), merupakan daerah yang bersifat "eferen". Disini imunogen mengadakan interaksi dengan sel yang telah terdeferensiasi dan menyebabkan sekresi antibodi oleh sel B atau menimbulkan reaksi sitotoksik oleh sel T. Dan kedua bagian dari sistem imun tersebut dihubungkan dengan mekanisme "*mucosal homing*" dalam arti bahwa sel yang telah disensitisasi didalam folikel limfoid akan mel-

kukan perjalanan ke daerah jaringan limfoid difus, ditempat ia dapat dapat melakukan interaksi dengan imunogen. “*Mucosal Homing*”, merupakan penampilan yang kharakteristik sistem imun dari mukosa, yang menunjukkan kemampuan “menghuni” dari berbagai sel yang dibentuk di folikel mukosa, dalam arti berbagai sel tadi dapat membatasi dan memfokuskan respons imun mukosalnya pada jaringan mukosa (Stites, 1994; Strober, 1994). Sedang Hiroshi Kiyono (1994) membagi sistem imun mukosa secara fungsional menjadi 2 bagian, yaitu :

1. Area induktif mukosal (*Mucosal Inductive Sites*) termasuk *Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT)* dan *Nasal-Associated Lymphoid Tissue (NALT)*. Dimana merupakan tempat strategis dalam sel pencernaan dan daerah naso faring (tonsil) untuk melawan imunogen.
2. Area efektor mukosal (*Mucosal Effector Sites*). Area ini , mempunyai kekhususan seperti berikut :
 - a. Terutama terdiri atas sel CD4 memori / efektor sel T
 - b. Kaya dengan sel B dan sel plasma yang sebagian besar dari isotipe igA.
 - c. Ditutupi oleh sel epitel yang memproduksi polimer imunoglobulin (plg) reseptor komponen sekretori (SC) yang mentransport plgA ke sekresi eksternal sebagai SigA (Hiroshi, 1994).



Gambar 2 : Diagram dari "Peyer's patches" (Walker Smith, 1986).

Daerah efektor terdiri :	Daerah induktif terdiri :
1. LPLs mengandung : limfosit B, T, sel plasma, makrofag, sel NK dan sel dendrit.	a. Lapisan epitel limfo mengandung limfosit dan sel M
2. IELs mengandung : sebagian besar sel T terutama CD ₈ dengan fungsi efektor imun spesial.	b. Daerah dome terdiri atas makrofag, sel NK, sel B, sel T terutama T CD ₄ dan sedikit sel plasma.
	c. GC (Germinal Centre): sebagian besar, sel B (B IgA)
	d. Daerah sel T terdiri atas sebagian besar sel CD ₄

2.11.1 Area Induktif Mukosal

"*Peyer's patches*" (Plaques Payeri) merupakan komponen terbesar dari MALT berisi folikel-folikel limfoid dalam usus kecil yang berfungsi sebagai tempat penarikan antigen usus dan berperan sebagai respons imun awal dari usus, dan penting sebagai sumber dari limfosit B & T serta diperkaya oleh prekursor IgA sel B. Setelah diaktifasi oleh antigen usus, limfosit didalamnya kemudian keluar dan berpindah ke lamina propria dan ke bagian intra epitelial.

Plaques Payeri terdiri atas 4 bagian :

- a. Limpoepitelium sebagai pelingkup plaques Payeri.

Limpoepitelium terdiri atas sel-sel khusus sebagai "antigen sampling" yang disebut M sel (Microfold cells), yang berupa sel pinositik. Sel-sel ini mengambil antigen, sebab pengambilan antigen bukan hasil dari pemecahan lisosom, maka antigen utuh dapat mencapai dasar dari jaringan limfoid dan menginduksi respon imun. Partikel masuk kedalam plaques Payeri melalui sel M dan diproses didalam area Dome oleh makrofag.

Sel M ini berbeda dengan sel epitel usus pada umumnya dalam hal kurangnya vilimikro dan glikokaliks serta tidak adanya organel lisosom, juga banyaknya mengandung vesikel pinsositik. Kemudian makrofag dan atau sel dendrit mempresentasikan antigen peptida kepada sel T helper. Sel M ini juga dilalui IgA keluar ke ekstraseluler/ cairan sekresi untuk melindungi mukosa.

Transpor antigen melalui permukaan sel M terjadi sebagai berikut :

1. Diawali oleh ikatan antigen pada permukaan sel M
 2. Antigen kemudian dimasukkan kedalam fesikel pinositotik
 3. Transpor vesikel melalui tubuh sel, dan
 4. Pelepasan antigen secara utuh kedalam daerah subepitelial.
- b. Area Dome, adalah daerah yang berada tepat dibawah limpoepitelium yang terdiri atas area sel B dan sel T dengan sejumlah makrofag, sel NK dan sedikit sel plasma. Sel-sel disini disebut juga sebagai sel Dome yang kaya dengan sel-sel MHC II, makrofag, sel dendrit dan sel B, dimana sel-sel ini mampu sebagai APC (sel penyaji antigen). Disini juga mengandung banyak sel T, dan sebagian besar adalah CD4 dengan sedikit CD8 (Stites, 1991).
- c. Folikel dengan senter germinal/area sel B
- Area sel B, adalah berupa folikel limfoid yang terdiri atas sebagian besar sel B sebagai penghasil Ig A.
- d. Parafolikuler atau area sel T
- Area sel T, terdiri atas sebagian besar sel T (CD4), APC klas II (interdigitating cells) dan HEV dimana limfosit masuk kedalam plaques Peyer. (Stites, 1991; Strober, 1991).

2.11.2 Area Efektor Mukosal

Terdiri atas 2 bagian yaitu *LPLs (lamina propria lymphocytes)* dan *IELs (intra epithelial lymphocytes)*

1. "*LPLs*" terdiri dari limfosit B, T, plasma sel, sel dendrit, makrofag, eosinofil dan mast sel. Kira-kira 80% limfosit dan plasma sel memproduksi Ig A, 15 – 20 % memproduksi Ig M dan kira-kira 2 % Ig E. Peningkatan spontan imunoglobulin oleh sel B dalam lamina propria usus kecil dan kolon membuktikan bahwa sel B disini lebih diaktifkan daripada dalam darah perifer.

Sekitar 25 – 40 % limfosit dalam lamina propria adalah sel T , dimana 95 % mempunyai alpha / betha TCR dan mayoritas adalah CD 4 dan kekurangan Leu 8.

Sel T penting untuk aktifasi lebih lanjut, pertumbuhan dan diferensiasi sel B lamina propria. Jumlah populasi sel B Dan sel T disini kurang lebih seimbang.

2. "*IELs*" adalah limfosit yang terletak diantara sel epitel pada permukaan mukosa, yaitu didekat basis sel epitel & membrana basalis.

Diperkirakan IELs adalah sel sitolitik dan sebagai garis pertama pertahanan pada mukosa usus. Pada orang sehat, kira-kira 1 IELs tiap 5-8 sel epitel pada usus halus dan 1 IELs tiap 20 sel epitel pada kolon.

IELs terdiri atas : 20 % tipe limfosit kecil, 80 % medium, dan ini dapat berkembang tanpa diproses dalam timus. Phenotipenya heterogen, sebagian besar terdiri dari sel T, yaitu CD3, CD2 dan terbanyak CD8 (Tc/TS). Selain itu juga mempunyai fungsi efektor imun yang spesial, termasuk sel NK, sel yang mensekresi gama interferon, dan reseptor gama / delta pada sel T (Stites 1997; Strober, 1991).

Induksi sel B dan sel T helper dalam *Peyer's patches* pada area induktif diikuti oleh migrasi mereka ke area efektor untuk perkembangan dari respons imun mukosal yang disebut *Common Mucosal Immun System (CMIS)*.

2.12 Komponen *Soluble Mediators* dari Sistem imun

2.12.1 Imunoglobulin (Ig)

Ig. merupakan molekul gliko protein yang tersusun 82 – 96 % polipeptida dan 4-18 % karbohidrat dan berfungsi untuk pertahanan tubuh (David, 1987; Stites, 1991; Kuby, 1992).

Berdasarkan isotypic determinants, Ig dibedakan menjadi lima macam yaitu : IgG, IgM, IgA, IgD dan IgE.

a. Imunoglobulin G

IgG dalam serum kira-kira 80 % dari jumlah total serum Ig. Dibagi atas subklas IgG1, IgG2, IgG3 & IgG4. IgG1, IgG3, dan IgG4 dapat menembus plasenta dan dikenal sebagai aktivator komplemen. Sedang afinitas IgG2 relatif kurang terhadap sistem komplemen. Waktu paruh dalam darah : IgG1 (21 hari), IgG2 (20 hari), IgG3 (7 hari), dan IgG4 (21 hari). (Stites, 1991, Kuby, 1992; Roitt, 1992).

b. Imunoglobulin M

IgM dalam serum kira-kira 5-10 % dari jumlah total Ig serum. Disekresi pada respons primer dan disintesa pada waktu neonatus . Daya netralisasi terhadap infeksi virus dan aktivitas sistem komplemen lebih kuat dibandingkan dengan IgG, IgM juga ada bersama-sama dengan sekretori IgA. Kadar IgM

pada cairan interseluler sangat rendah, sebab IgM tidak bisa berdifusi dengan baik. Waktu paruhnya dalam darah adalah 10 hari. (Stites, 1991; Kuby 1992; Roitt, 1992).

c. Imunoglobulin A

IgA dalam serum kira-kira 10 – 15 % dari jumlah total serum Ig. Merupakan Ig yang dominan pada organ sekresi eksternal. IgA tersebut berfungsi terutama untuk menghambat pertumbuhan koloni bakteri maupun virus yang akan menginfeksi melalui mukosa. Waktu paruh dalam darah 6 hari. (Stites, 1991; Kuby, 1992; Roitt, 1992).

Menonjolnya Ig A dalam cairan eksternal oleh karena lebih banyaknya limfosit B yang berada dalam jaringan mukosa. Apabila Ig A telah disekresi oleh limfosit dalam lamina propria, secara terpilih diangkut melintasi lapisan epitel untuk berfungsi dalam cairan eksternal.

Sekresi secara selektif Ig A didahului oleh adanya struktur khas dari imunoglobulin ini sehingga dapat diikat oleh adanya reseptor khusus pada sel epitel. Struktur Ig A, seperti juga imunoglobulin lain memiliki 4 rantai subunit monomer polipeptida. Rantai alfa pada ujungnya mempunyai kepanjangan yang mengandung sistein sehingga memungkinkan pengikatan oleh sulfida membentuk polimer Ig A (plgA). Pembentukan plgA ini sangat menentukan pengikatan dengan reseptor pada epitel yang dinamakan *secretory component* (SC). SC yang bebas maupun terikat oleh plgA akan mengalami endositosis sel epitel dan dilepaskan melalui permukaan epitel kedalam cairan eksternal. Sehingga dalam cairan eksternal terdapat SC dan slgA (plgA yang

terikat oleh SC), kecuali pada orang yang mengalami defisiensi IgA, hanya SC saja. Pengikatan pIgA yang telah mengikat antigen oleh SC dapat membantu membersihkan kelebihan antigen dalam darah.

Bentuk pIgA maupun bentuk sIgA dengan SC merupakan molekul yang tahan terhadap enzim proteolitik. IgA yang mengikat permukaan bakteri dapat mengurangi mobilitasnya, sehingga menghambat penempelan bakteri pada permukaan epitel mukosa. Kenyataan menunjukkan bahwa orang yang mengalami defisiensi IgA mudah mengalami infeksi usus, atopi, penyakit otoimun dan mudahnya absorpsi alergen makanan. Sedang fungsi IgA dalam darah mungkin berperan dalam pembersihan antigen dan pengaturan imun.

Epitel yang menutupi jaringan mukosa sebenarnya tidak merupakan penghalang mekanik yang sempurna terhadap makromolekul dan beberapa antigen. Tempat-tempat penerobosan antigen biasanya melalui daerah villi diantara sel-sel epitel, atau melalui sel epitel atau sel limfoepitel. Oleh karena itu potensi adanya interaksi antara antigen dan jaringan limfoid sangat luas sepanjang mukosa usus.

Pembatasan pengambilan antigen dalam kondisi sehat akan membantu mengatur respons lokal. Namun pada kondisi sakit, permeabilitas epitel akan berubah sehingga akan mengacaukan respons imun lokal terhadap kenaikan jumlah antigen ini. Epitel sangat efisien dalam memilih antigen dan faktor-faktor yang diduga mempengaruhi pengambilan antigen oleh mukosa usus, antara lain adalah mudah tidaknya antigen tersebut dicerna selama perja-

lanannya melalui lambung dan usus, keadaan flora usus dan sifat kimiawi dari antigen (Tomasi, 1982; Stites, 1991).

Slg A, mempunyai beberapa fungsi biologik, sebagai :

1. antiviral
2. antitoksin
3. antibakterial, dan pencegahan absorpsi terhadap antigen bukan organisme.

d. Immunoglobulin E

IgE dalam serum kira-kira 0,002 % atau 0,3 mikrogram / ml. LgE tersebut berfungsi sebagai mediator reaksi hipersensitifitas. Waktu paruh dalam darah juga relatif cukup singkat yaitu 2 hari. (Stites, 1991; Kuby, 1992; Roitt, 1992).

e. Immunoglobulin D

IgD dalam serum kira-kira 0,2 % atau 30 mikrogram/ml. Fungsi biologik IgD masih belum banyak diketahui. Waktu paruh dalam darah kira-kira 3 hari. (Stites, 1991; Kuby, 1992; Roitt, 1992)

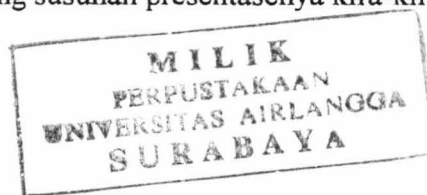
2.12.2 Sitokin

Sitokin merupakan semua mediator kimia yang dihasilkan oleh sel komponen sistem imun, kecuali yang dihasilkan oleh kelenjar khusus (hormon). Sitokin meliputi limfokin dan mediator lain yang berperan dalam pengendalian respons imun. (Clemens, 1991).

2.13 Membran Sel Mukosa Usus

Struktur membran sel adalah tipis dan elastis, kira-kira 75 – 100 Angstroms. Ia terdiri atas hampir seluruhnya protein dan lipid, yang susunan presentasinya kira-kira 62

49



% protein, 35 % lipid dan 3 % polisakarida. Protein dalam sel terutama yang disebut tektin, merupakan struktur protein yang tidak larut dan elastis. Lipid, kira-kira 60 % fosfolipid, 25 % kolesterol, dan 15 % lipid lainnya.

Jadi membran sel berupa suatu lapisan sentral yang terdiri dari lipid yang dilapisi oleh lapisan protein dan lapisan tipis mukopolisakarida pada permukaan luarnya. Adanya protein dan mukopolisakarida pada permukaannya membuat membran bersifat *hidrofilik*, yang berarti bahwa air melekat dengan mudah pada membran. Lipid yang terletak ditengah membran membuat membran terutama dapat ditembus oleh zat-zat yang larut dalam lipid, jadi bersifat *lipofilik*. Ketiga lapisan tersebut dinamakan *unit membran*, yang walaupun terdiri atas 3 lapisan, tetapi secara fungsional merupakan suatu kesatuan (Moffett, 1993).

Pendapat yang lain tentang membran sel yang banyak mendapat dukungan dan mempunyai banyak bukti adalah bahwa : struktur dasar membran hampir seluruhnya lipid, dengan sedikit protein pada kedua permukaannya. Protein juga tampak tersebar diseluruh lipid, dimana ia banyak melakukan fungsi penting, yaitu :

1. memberikan kekuatan struktural pada membran
2. bekerja sebagai enzim untuk mempermudah reaksi kimia
3. bekerja sebagai protein pengemban (carrier) untuk transport zat-zat melalui membran
4. menguraikan zat lipid. (Guyton, 1991)

2.14 Teori Perkiraan Mekanisme Kerja ABS pada Mukosa Usus.

Banyak teori yang memungkinkan terjadinya kerusakan sel oleh ABS/LAS antara lain :

1. ABS yang merupakan bahan yang bersifat toksis, akan merusak sel epitel mukosa usus (Artman, 1982), sehingga diperkirakan tidak bisa menghasilkan komponen sekretorik /SC, oleh karena itu tidak akan terjadi ikatan SC ini dengan IgA, padahal SigA ini berfungsi sebagai proteksi mukosa usus.

Selain itu SC juga memudahkan transpor Ig A dalam cairan sekresi dan melindungi IgA terhadap enzim proteolitik yang terdapat dalam cairan itu. Akibat dari berbagai hal tersebut maka ABS ini akan merusak/menghilangkan fungsi proteksi dari IgA, sehingga absorpsi antigen akan tidak terbatas, juga masuknya mikroorganisme lain melalui saluran cerna tidak bisa dicegah. Karena kerusakan mukosa ini terjadi kronis maka jaringan limfoid sepanjang saluran cerna akan ikut rusak juga, sehingga akan terjadi perubahan pemetaan berbagai sel imunokompeten yang menghasilkan perubahan respons imun mukosal (gangguan morfofungsi).

2. Surfaktan ABS sebagai zat aktif penurun tegangan permukaan cairan, akan menurunkan tegangan permukaan atau bahkan merusak membran *lipid bilayer* dari mukosa usus. Kecuali itu juga sifat ABS sebagai molekul hidrofilik dan lipofilik, akan larut kedalam membran tersebut. Apabila ABS dapat melalui sel M dan sel epitel, segera akan menginduksi respons imun di area Dome, area sel B, area sel T, dan limfosit lamina propria. Sehingga ABS akan menyebabkan perubahan pemetaan dan komposisi elemen limfoid dari mukosa usus (perubahan morfofungsi). Dengan akibat mungkin terjadi

- supresi atau aktivasi dari respons imun mukosal yang dicerminkan oleh berbagai elemen limfoid yang menyusun pola imunopatologik mukosa usus.
3. ABS sebagai *stressor* terhadap sel M & sel epitel mukosa usus, yang berlaku sebagai *stress cell*, dan sel ini akan melepaskan *stress signaling substances* yang akan menyebabkan perubahan pemetaan *immunocompetence cell* di mukosa sehingga akan memodulasi respons imun mukosal pada usus.
 4. ABS juga mungkin menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif sehingga dapat merusak membran sel epitel, sel M maupun sel-sel yang lain. Terjadinya akumulasi radikal bebas pada ABS akan menyebabkan gangguan fluiditas membran sehingga fungsi barrier sel membran rusak karena kekacauan permeabilitas membran dan inaktivasi sistem enzim akhirnya bisa terjadi kerusakan DNA dan kematian sel.
 5. Kecuali itu paparan ABS pada manusia mungkin menyebabkan iritasi kronis pada mukosa usus akan merupakan stres fisik yang akan menurunkan respons imun melalui mekanisme limbik sistem apalagi jika ada perubahan estetika air karena ABS akan menyebabkan stres psikhis yang akan menambah penurunan respons imun melalui limbik sistem/HPA aksis.

Menurut Swisher, RD (1968) yang diperkuat oleh Loomis (1978), menyatakan bagaimana molekul deterjen yang larut air dapat melalui suatu membran sebagai berikut:

1. Filtrasi langsung melalui pori-pori membran
2. Proses difusi pasif yang disebabkan karena perbedaan tingkat konsentrasi cairan extra seluler dan intra seluler

3. Proses dari sistem transport kusus dengan melalui larutan larut air melewati membran dengan lemak sebagai molekul karier atau pembawa dimana terjadi kompleks kimia efektif. Ini disebabkan adanya bagian lemak yang terdapat pada membran sel, dimana lemak ini sebagai pembawa molekul deterjen tersebut (*Lipid soluble carrier molecule*).

2.15 Paradigma Patobiologis dengan konsep sel yang mengalami stres (*stess cell*)

Paradigma patobiologis, yaitu paradigma yang didasarkan atas perubahan biologis yang menyimpang/tidak lazim akibat interaksi individu dengan lingkungan, paradigma ini sebagai perkembangan awal dari paradigma psikoneuroimunologi (PNI) (Putra, 1997).

Secara historis PNI berkembang dari area kajian yang melibatkan tiga bidang studi, yaitu studi tentang kesadaran (*psycho*), sistem syaraf pusat & perifer (*neuro*) dan imunologi, karena itu selama ini PNI lebih mudah dipahami berdasar studi tersebut.

Psikoneuroimunologi (PNI) tingkat individu diawali dari model berpikir/paradigma yang didasarkan atas penurunan respons imun pada kondisi stres, dimana paradigma tersebut dikembangkan berdasar atas keterkaitan 3 konsep, yaitu konsep behavior, konsep neuroindokrin dan konsep imunologik (Ader, 1991).

Menurut Pelletier & Herzing, 1988 PNI adalah studi mengenai interaksi antara kesadaran (*psycho*), otak dan sisten syaraf pusat (*neuro*) dan mekanisme pertahanan tubuh untuk melawan infeksi dari luar dan pembelahan sel yang abnormal.

Sejak terungkapnya stres protein maka penelitian stres pada sel terus berkembang, tidak hanya berlaku untuk individu tingkat tinggi, tetapi juga menggambarkan kondisi sel dalam merespons *stressor*. Konsep PNI lebih terfokus pada

perilaku *immunocompetence cell* yang mengalami stres, ini akan berlaku umum mulai dari individu (manusia, binatang) sampai ke sistem, organ, sel bahkan gen. Konsep ini menekankan perubahan perilaku yaitu modulasi fungsi sistem imun karena stres sebagai hasil akhirnya. Secara bertahap dan dalam waktu yang lama PNI berkembang dengan suatu paradigma yang terfokus pada modulasi fungsi sistem imun yang mengalami stres (Putra, 1999).

Pada penelitian ini sel yang mengalami stres adalah sel epitel mukosal yang merupakan *immunocompetence cell* sehingga sistem imun ikut merasakan efek stres tersebut. Bila sistem imun yang mengalami stres maka fungsi tersebut akan mengalami modulasi. Untuk menjelaskan model modulasi kualitas sistem imun tersebut akan digunakan paradigma PNI tingkat sistem yaitu model berfikir PNI pada sel, dengan hasil akhir perubahan modulasi sistem imun.

Berbagai hasil penelitian pada sel yang mengalami stres menunjukkan bahwa pada *stress cell* terjadi *stress signaling substances* yang dapat meneruskan signal ke sel lain (Putra, 1999). Bila terjadi pada sistem imun maka sistem imun akan mengalami modulasi. Dengan melakukan abstraksi dan ekstrapolasi dari berbagai perubahan perilaku pada individu, sistem imun dan sel imun yang stres, maka secara konseptual PNI mempunyai kesamaan dengan stres pada *immunocomptence cell* , sehingga istilah PNI dapat digunakan untuk menggambarkan modulasi sistem imun sebagai imbas dari stres pada manusia dan binatang, termasuk individu yang sederhana, yang berperan pada sistem imun yaitu stres pada sel *immunocompetence*.

Gambaran perubahan pemetaan komposisi elemen limfoid yang terjadi adalah merupakan akibat suatu proses perubahan respons imun (Putra, 1984). Dengan melihat

perubahan morfofungsi dari komposisi komponen sistem imun yang terjadi pada mukosa usus maka dapat diketahui perubahan pola respons imun mukosal yang diakibatkan oleh pemaparan ABS per-oral. Pola tersebut adalah suatu gambaran yang terjadi oleh berbagai elemen imunologik yang membentuk suatu komposisi di dalam mukosa usus, dengan memperhitungkan besarnya kontribusi masing-masing elemen pada komposisi tersebut. Pola yang terjadi merupakan komposisi variabel yang membentuk kontribusi. Selanjutnya model kajian tersebut digunakan untuk memecahkan masalah penelitian ini.

Mengingat model kajian tersebut menitikberatkan pada konsep *stress cell* di mukosa, maka perubahan morfofungsi di mukosa yang diakibatkan oleh paparan ABS dalam deterjen per-oral merupakan sumber variabel yang akan digunakan untuk mendapatkan data untuk melakukan uji hipotesis. Berdasar pada konsep tersebut, suatu hipotesis akan dikembangkan, dengan demikian maka pembuktian hipotesis atas uji tersebut akan dapat memecahkan masalah penelitian ini.

Konsep *stress cell* dalam penelitian ini merupakan pemahaman peneliti terhadap perubahan respons imun mukosal yang patologik, yang diakibatkan oleh karena *stressor*. Konsep ini digunakan untuk mengungkap perubahan respons imun sebelum terjadi kelainan yang dapat diketahui secara klinik (Putra, 1990). Paradigma morfofungsi digunakan dalam penelitian ini mengingat adanya struktur khusus yang berupa pemetaan populasi limfosit tertentu dengan fungsi yang berbeda didalam jaringan mukosa usus. Sehingga bila terjadi gangguan dalam jaringan mukosa usus karena pengaruh *stressor* asing peroral akan mengubah pemetaan elemen imunologik di mukosa.

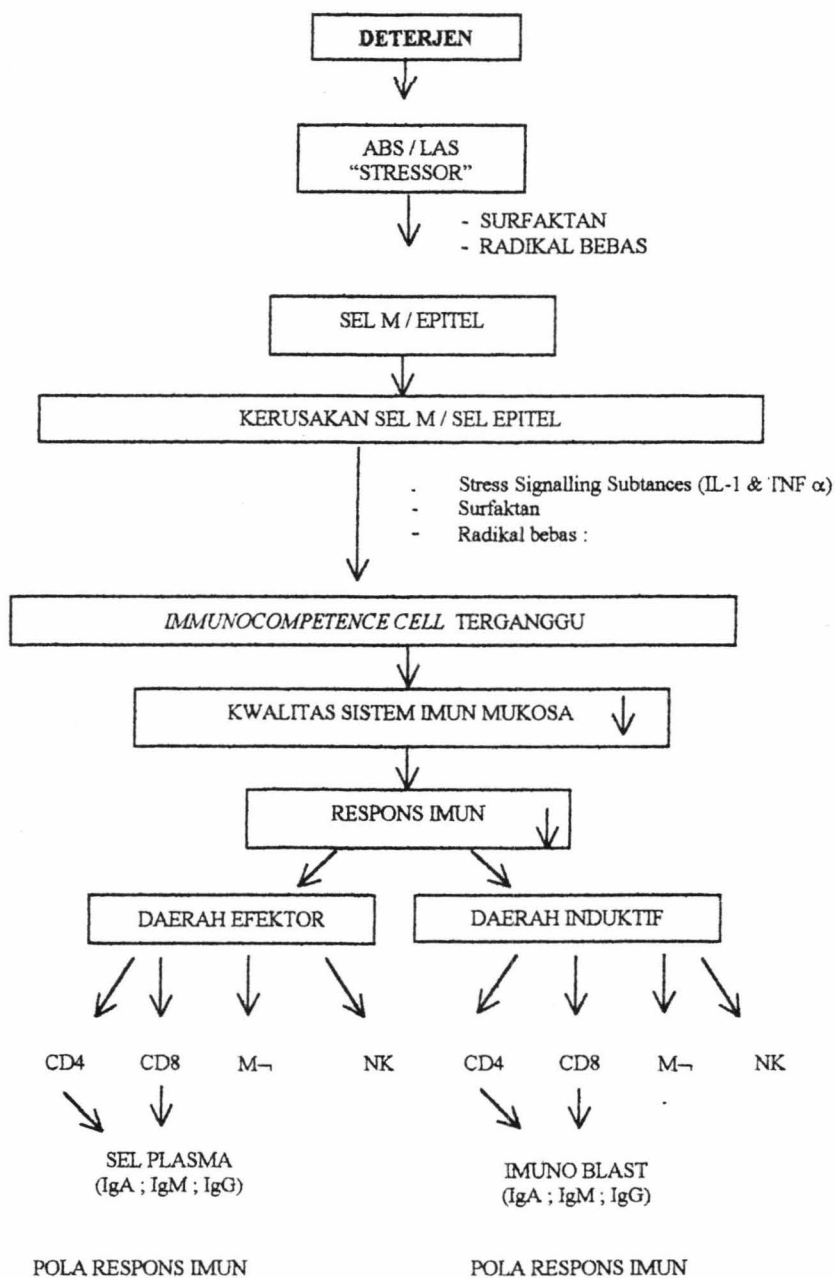
Selain perubahan pemetaan tersebut, juga akan mempengaruhi struktur dari masing-masing elemen imunologik beserta produknya. Dengan pengecatan khusus bisa

dilihat produk elemen imunologik yang menggambarkan fungsi dari elemen tersebut, yang akhirnya akan mempengaruhi respons imun mukosal usus.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

Kerangka konseptual penelitian tersebut diatas merupakan penjabaran paradigma patobiologis sistem imun yang berkonsep pada *stress cell*.

Landasan konsep yang digunakan untuk menjawab permasalahan dalam penelitian ini adalah melalui paradigma patobiologis yang berkonsep pada stress cell yaitu model berfikir yang berdasar pada perubahan biologis yang merugikan akibat interaksi individu dengan lingkungan yang mengakibatkan sistem imun mengalami stres. Untuk mewujudkan variabel menjadi data sekaligus untuk melihat pengaruh paparan deterjen digunakan pemeriksaan morfofungsi dengan imunositokimia. Pemeriksaan morfofungsi adalah untuk melihat perubahan morfologi sel yang fungsional (Putra, 1997). Dengan pemeriksaan morfofungsi disertai rancangan penelitian *the post test control group design*, akan mendapatkan data *post test*. Untuk melihat perubahan respons imun maka dibandingkan antara post test pada semua perlakuan, ABS sebagai kelompok perlakuan pertama, LAS sebagai kelompok perlakuan kedua dan Aqua pada kelompok kontrol sehingga dapat dijelaskan perubahan respon imun yang terjadi karena paparan ABS/LAS.

Agar perubahan respon imun dapat mencerminkan perubahan respon imun akibat adanya *stressor* pada *stress cell* dengan jelas dan mempunyai makna maka dibuat pola. Pola tersebut berupa pola perubahan respons imun mukosal. *Stressor* (ABS/LAS) akan menyebabkan perubahan *behavior/* fungsi dari *stress cell* (Sel M & Sel epitel) dalam memodulasi respons imun.

Pola yang terbentuk nanti adalah pola perubahan respons imun (▲)

▲ ABS - Aqua dan ▲ LAS - Aqua

Hipotesis Penelitian

Pemberian Alkil Benzen Sulfonat/Linier Alkil Benzen Sulfonat dalam deterjen per-oral pada usus mencit akan menurunkan respons imun di mukosa usus mencit, berdasarkan pada pola perubahan patobiologik mukosal yang terjadi yaitu :

1. Pemberian paparan ABS per-oral dapat menurunkan imunitas humoral pada daerah induktif mukosal serta menurunkan imunitas humoral dan imunitas seluler pada daerah efektor mukosa usus mencit. Pemberian paparan LAS per-oral dapat menurunkan imunitas seluler pada daerah induktif mukosal serta menurunkan imunitas humoral dan imunitas seluler pada daerah efektor mukosa usus mencit.
2. Respons imun mukosa usus mencit yang terjadi pada paparan ABS per-oral berbeda dengan respons imun mukosa usus mencit pada paparan LAS per-oral.

B A B 4

METODE PENELITIAN

4.1 Metode Penelitian

4.1.1 Jenis penelitian

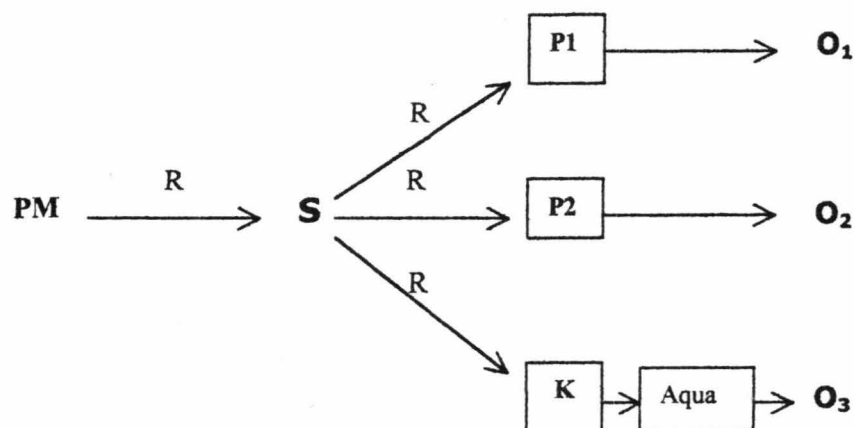
Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental . Sebab, penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh paparan ABS/LAS terhadap respon mukosa usus yang diberikan pada kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol kemudian dicari perubahan respons imun (Δ) antara kelompok P1 dengan K serta kelompok P2 dengan K . Adapun prinsip yang dipenuhi dalam penelitian eksperimental meliputi pertama, replikasi yaitu suatu kondisi perlakuan yang diberikan sama kepada sejumlah sampel dalam kelompok perlakuan. Kedua, randomisasi dimana dilakukan pada saat pembagian sejumlah sampel penelitian untuk ketiga kelompok penelitian, yaitu kelompok yang diberi paparan dengan ABS, kelompok yang diberi paparan dengan LAS, dan kelompok yang hanya diberi Aqua sebagai kelompok kontrol. Untuk menambah validitas dalam penelitian eksperimental tersebut digunakan kelompok kontrol (Zainuddin, 1988; Pudji Rahardjo, 1993).

4.1.2 Rancangan Penelitian

Untuk memecahkan masalah dalam penelitian digunakan jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *The posttest-only control group design*.

Rancangan tersebut dipilih karena diasumsikan bahwa di dalam suatu populasi tertentu tiap unit populasi adalah “homogen”, artinya semua karakteristik antar unit

populasi adalah sama. Pengukuran awal tidak dilakukan oleh karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi, sehingga dikembangkan rancangan eksperimental tanpa ada pengukuran awal/pretest tetapi hanya postes saja (Zainuddin, 1988).



PM : Populasi mencit (100 ekor)

S : Sampel (30 ekor)

R : Randomisasi mencit

P1 : kelompok mencit yang diberi paparan ABS

P2 : kelompok mencit yang diberi LAS,

K : Sampel mencit kelompok kontrol, hanya diberi Aqua

O₁
O₂
O₃ } = Observasi dalam kelompok tes setelah perlakuan

Pola perubahan respons imun dengan pendekatan pada sel yang mengalami stres, yang diamati adalah :

P₁ - K → ▲

P₂ - K → ▲

4.1.3 Pendekatan

Dalam penelitian ini menggunakan paradigma patobiologis, sedangkan konsep yang digunakan untuk melihat pengaruh ABS/LAS adalah sel yang mengalami stres (*stress cell*), yang berupa perubahan respons imun mukosal usus secara morfofungsi. Perubahan tersebut dipolakan untuk mengetahui kontribusi setiap perubahan variabel terhadap aktifitas biologisnya. Konsep tadi bersifat multi variabel, untuk perangkat uji statistik yang digunakan adalah uji statistik multivariat.

Pola perubahan respons imun (▲) dengan pendekatan pada sel yang mengalami stres, yang diamati adalah :

1. ABS → ▲ dari ABS (P1) – Aqua (K)
2. LAS → ▲ dari LAS (P2) – Aqua (K)

4.2 Populasi, sampel dan besar sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah mencit putih galur BALB/c (Out bred) yang diperoleh dari kandang hewan percobaan Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma), Direktorat Jendral Peternakan, Departemen Pertanian R.I. jalan Ahmad Yani 68-70 Surabaya.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian menggunakan mencit jantan dewasa berumur 45 – 60 hari, dengan berat badan antara 25-35 gram, dengan alasan secara seksual mencit telah

dewasa (*sexually mature*) dan perubahan berat badan selama proses penelitian relatif kecil (Hume, 1972). Dengan menggunakan hewan coba mencit *Mus musculus galur BALB/c* yang diperoleh dari pusat Veterinaria Farma Surabaya, Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian R.I.

4.2.3 Besar sampel

Besar sampel dihitung menggunakan rumus :

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot QD^2}{d^2}$$

(Pujirahardjo, 1993)

n = besar sampel dalam masing-masing kelompok

Z_{α} = nilai standart normal yang besarnya tergantung bila

$$\alpha = 0,05 \rightarrow Z = 1,67$$

$$\alpha = 0,01 \rightarrow Z = 1,96$$

Z_{β} = nilainya tergantung yang ditentukan (tabel)

β = pover test

Untuk grup yang berpasangan $QD^2/d^2 = 1$

Sehingga hasilnya : $n = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2$

$$Z_{\alpha} = 1,67$$

$$Z_{\beta} = 1,28$$

$$n = (1,67 + 1,28)^2 = 8,70 = 9$$

Berdasarkan tabel dari *Number of observations for t-test of defference between two means*, dengan $\alpha = 0,05$ besar sampel masing-masing kelompok = 9. Dalam penelitian ini digunakan 10 ekor untuk tiap kelompok. Sampel keseluruhan berjumlah 30 ekor.

4.3 Teknik Pengambilan sampel

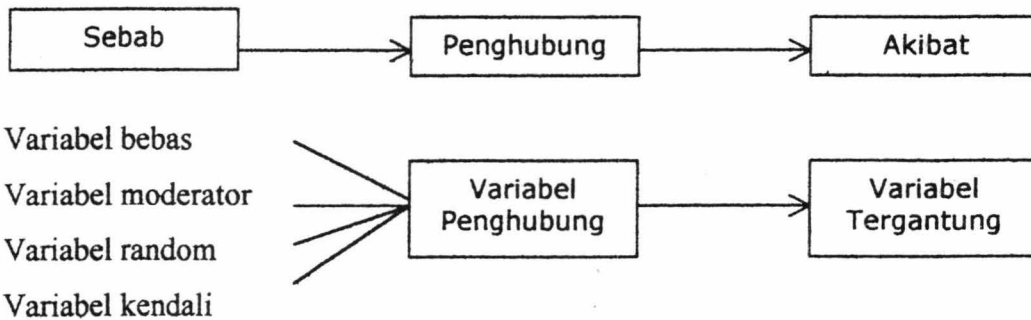
Penggunaan/pemakaian metode *Simple Random Sampling* didasarkan atas alasan walaupun populasi mencit dalam kandang pemeliharaan telah diusahakan dalam kondisi perawatan yang sama, misalnya makanan & minuman sama, situasi kandang sama, jenis & spesies yang digunakan sama, umur mencit sama tetapi masih didapat perbedaan dalam hal berat badan/BB mencit (Hume, 1972) . Perbedaan BB setara dengan perbedaan jumlah sel imunokompeten dalam tubuh, seperti jumlah total limfosit yang berbeda (Scalm, 1975).

Randomisasi pengambilan sampel dilakukan dengan cara : populasi mencit galur BALB/c yang berumur antara 45-60 hari dengan BB 25-35 gr, diberi nomor mulai angka 001 sampai 100. Pemilihan sampel pengujian dilakukan dengan menggunakan "Tabel Random " . Dengan memakai 3 digit didapat nomor-nomor sbb.: 043; 055; 0,35; 009; 002; 001; 008 dst., sehingga diperoleh 30 sampel. Dari 30 sampel yang diperoleh nomor-nomornya dibuang, kemudian dilakukan random subyek penelitian (peserta) untuk dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok A (ABS); L (LAS), & K (kontrol), masing-masing 10 ekor.

	L	K
1	2	3
4	5	6
7	8	9 dst.

4.4 Identifikasi dan pengukuran variabel

4.4.1 Skema hubungan antara variabel



4.4.2 Klasifikasi Variabel

- a. Variabel bebas : Pemberian per-oral bahan aktif deterjen yaitu bahan aktif alkil benzene sulfonat rantai bercabang (ABS) dan rantai lurus (LAS). Pemberian per-oral melalui mikropipet sebanyak 0,1 cc larutan yang berisi 6,25 mg ABS juga 0,1 cc larutan yang berisi 6,25 mg LAS untuk setiap ekor mencit selama 7 hari berturut-turut (Wagner, 1991; Ma'at, 1996).
- b. Variabel moderator : jenis larutan bahan aktif deterjen yaitu alkil benzene sulfonat rantai bercabang (ABS) dan rantai lurus (LAS).

- c. Variabel random : berat badan mencit dan umur mencit
- d. Variabel kendali : (1) mencit jantan BALB/c, (2) kandang mencit, (3) pakan Pelet, (4) minuman Aqua, (5) pemeliharaan mencit, (6) metode pemeriksaan, dan (7) cara pemberian dan dosis bahan paparan.
- e. Variabel penghubung : cara kerja ABS/LAS dalam mempengaruhi sistem imun.
- f. Variabel tergantung : Variabel tergantung adalah variabel yang hendak diteliti. Variabel tersebut adalah variabel yang diharapkan dapat mencerminkan konsep *stress cell* yaitu perubahan respons imun pada sel yang mengalami stres. Variabel tersebut adalah (1). SP IgA, (2). SP IgM, (3). SP IgG, (4). Limfosit T CD₄⁺, (5). Limfosit T CD₈⁺, (6) Sel NK dan (7). Sel Makrofag.

4.4.3 Definisi operasional variabel

- a. Paparan ABS/LAS adalah : Pemberian larutan ABS/LAS per-oral dengan dosis yang telah ditentukan dengan menggunakan semprit 1 cc dengan jarum nomor 18 G yang ujungnya diberi bulatan terbuat dari logam yang tumpul.
- b. Paradigma patobiologis pada sistem imun mukosal yang berkonsep *stress cell* adalah model berfikir yang berdasar pada perubahan biologi sistem imun mukosal yang merugikan yang disebabkan oleh *immunocompetence cell* yang mengalami stres. Pemikiran ini secara konseptual ada kesamaan dengan model berfikir PNI di mukosa, selanjutnya dikenal sebagai PNI mukosal (Putra, 1999).

4.4.4 Bahan Penelitian

ABS & LAS merupakan surfaktan tehnik, berkadar 95 % diperoleh dari PT Aktif Indah Surabaya. Kemudian dilakukan pemurnian bahan tersebut dengan menggunakan Khromatografi kolom, dengan menggunakan eluen khloroform dan adsorbent silika gel, dengan maksud untuk memisahkan ABS/LAS dari komponen yang lain. Tempat pemurnian tersebut di Laboratorium Dasar Bersama Unair, sehingga didapat surfaktan ABS dan LAS murni untuk penelitian.

4.5 Tatalaksana Penelitian

4.5.1 Penelitian pendahuluan untuk memilih dosis penelitian

Pemeriksaan pendahuluan dilakukan di laboratorium Farmakologi FK. Unibraw untuk menentukan / menguji dosis letalis. Dengan dosis awal menggunakan dosis letalis yang telah didapatkan oleh Dr Bambang Purnomo drh dari Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya. Pada penelitian tentang efek teratogenik ABS pada mencit yaitu 1,81 gr / KBB atau 54,3 mg / ekor mencit. Dengan memakai 25 ekor mencit dan menggunakan rasio pengenceran dipilih dosis untuk penelitian.

Mencit tersebut dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 5 ekor mencit dengan pengenceran 100 % sampai 6,25 %.

Kelompok	Pengenceran	Dosis/ekor	Jml. Mencit	Mati	Hidup
I	100 %	50 mg	5	5	0
II	50 %	25 mg	5	2	3
III	25 %	12,5 mg	5	2	3
IV	12,5 %	6,25 mg	5	0	5
V	6,25%	3,125mg	5	0	5

Sehingga pada penelitian ini dipilih dosis pengenceran 12,5 % dari LD 50 yang sudah ditemukan yaitu sebesar 6,25 mg / ekor mencit dalam 0,1 cc larutan, dengan maksud supaya mencit tetap hidup semua.

4.5.2 Pemeliharaan mencit

Mencit dipelihara, agar diperoleh mencit dengan kondisi dan persyaratan yang sesuai dengan penelitian imunologi (Herbert, 1986). Pengendalian awal hewan coba tersebut dilakukan dengan konsep PNI, dimana sebelum dilakukan pengujian mencit yang terpilih secara random dikelompokkan terlebih dahulu sekurang-kurangnya 1 minggu, agar terbentuk lingkungan sosial yang stabil diantara mencit-mencit tersebut. Mencit yang terlalu agresif dikeluarkan dari kelompok begitu juga yang selalu kalah dalam pertarungan, ini untuk menghindarkan nilai bias dari respons imun yang bukan karena perlakuan.

a. Kandang hewan percobaan

Mencit ditempatkan dalam kurungan atau tempat yang terbuat dari bak plastik dengan ukuran 40 x 30 x 13 cm, ditutup dengan anyaman kawat, beralaskan sekam. Sebelum digunakan, kurungan tersebut didesinfektan dengan cara disemprot dengan larutan alkohol 70 %, sedangkan sekam untuk alas, dioven pada suhu 160°C selama 2 jam dan disimpan dalam wadah yang rapat sebelum digunakan. Kurungan-kurungan tersebut ditempatkan dalam ruangan yang terisolasi dengan ventilasi udara yang baik & penerangan yang alam (Yen, 1995)

b. Makanan hewan percobaan

Selama pemeliharaan dan pengujian, mencit hanya diberi 1 macam makanan, yaitu "Par G Pelet" produksi PT Japfa Comfeed Sidoarjo dengan nomor registrasi 187158, dengan kandungan isi sebagai berikut :

Protein 15-16 %, lemak 4-6 %, serat 5-6 %, kalsium 0,9 – 1,1 %, fosfor 0,6 – 0,8 %, abu 5 % dan metabolis energi (Kcal/kg) 2500 – 270₀. (brosur PT. Comfeed Indonesia Ltd).

c. Minuman hewan uji

Selama pemeliharaan dan pengujian hanya diberi 1 macam minuman yaitu air kemasan dalam botol Aqua produksi air minum Pandaan.

4.5.3 Persiapan hewan uji

Mencit diambil secara random dari kandang hewan percobaan yang berasal dari populasi galur BALB/c, dengan berat badan antara 25 – 35 gram dan jenis kelamin jantan.

Mencit yang terpilih ditempatkan dalam satu kurungan masing-masing 10 ekor, dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu 2 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Sebelum digunakan untuk pengujian, mencit tersebut di adaptasikan selama 1 minggu untuk hidup bersama dalam 1 kurungan. Kalau ada mencit yang bersifat agresif segera diganti dengan yang baru, sampai didapatkan mencit yang hidup rukun dalam 1 kurungan.

4.5.4 Penanganan selama pengujian

Selama pengujian, mencit uji harus dipisahkan ruangnya dengan mencit stok, ditempatkan dalam laboratorium di tempat yang sedikit gelap.

Kemudian setiap kelompok diberi paparan per-oral pada waktu pagi hari, selama 7 hari berturut-turut : kelompok pertama diberi 0,1 cc larutan ABS berisi 6,25 mili gram ABS; kelompok kedua diberi 0,1 cc larutan LAS berisi 6,25 mili gram LAS; dan kelompok ketiga diberi 0,1 cc Aqua, sebagai kontrol .

Pada hari ke 8, mencit-mencit tadi dimatikan dengan refleks Vagal, kemudian dibuka perutnya untuk diambil usus halus dengan *peyer patches*nya pada daerah ileum yang secara makroskopis mengandung kira-kira 4 buah *peyer patches* . Masing-masing usus dibagi menjadi 2 bagian, sebagian untuk sediaan dengan blok parafin dikerjakan di laboratorium Histologi FK Unair untuk pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia di Laboratorium Pato Biologi Gramik FK. Unair, sebagian lagi untuk irisan jaringan segar yang dikerjakan di Laboratorium Patologi Anatomi RS dr. Sutomo untuk pemeriksaan imunohistokimia.

4.6 Tempat dan waktu penelitian

4.6.1 Tempat penelitian

Penelitian dikerjakan di :

1. Lab. Dasar Bersama Unair.
2. Lab. P.K. RS dr. Sutomo
3. Lab. P.A. R.S dr. Sutomo
4. Lab. P.A. F.K. Unair.

5. Lab. Histologi F.K. Unair.
6. Lab. GRAMIK F.K Unair.
7. Lab. Biomedik F.K. Unibraw.

4.6.2 Waktu Penelitian

Waktu Penelitian sampai selesainya pelaporan kurang lebih selama 30 bulan.

1. Studi Pustaka 6 bulan.
2. Pemilihan pendahuluan 8 bulan terdiri atas.
 - a. Persiapan bahan penelitian 3 bulan
 - b. Persiapan tempat penelitian 1 bulan
 - c. Pembuatan kandang mencit 1 bulan
 - d. Pelaksanaan penelitian 3 bulan
3. Penelitian 8 bulan terdiri atas :
 - a. Penelitian 3 bulan
 - b. Pemeriksaan hasil penelitian 5 bulan
4. Pengumpulan, pengolahan & Analisis hasil peniltian 4 bulan
5. Penulisan hasil penelitian 4 bulan

4.6.3 Jadwal Kegiatan

Waktu kegiatan

Kegiatan	4	8	12	16	20	24	28	30
1. Studi Pustaka	xxxx	Xx						
2. Penelitian Pendahuluan								
a. Persiapan bahan penelitian 3 bulan		Xx	x					
b. Persiapan tempat penelitian 1 bulan			x					
c. Pembuatan kandang mencit 1 bulan			x					
d. Pelaksanaan penelitian 3 bulan			x	xx				
3. Penelitian								
a. Penelitian				xx	x			
b. Pemeriksaan hasil penelitian						xx		
4. Pengumpulan, pengolahan & analisis hasil penelitian 4 bulan					xxx			
5. Penulisan hasil penelitian 4 bulan						xx	xx	xxxx

4.7 Prosedur pengambilan atau Pengumpulan Data

Populasi penelitian adalah mencit Mus Musculus BALB/c yang dipersiapkan khusus di Laboratorium Pusvetma Wonocolo Surabaya dan pemeliharaannya di laboratorium P.A FK. Unair. Mencit ditempatkan pada ruangan khusus pemeliharaan mencit, dikontrol 24 jam segala kebutuhan mencit dicukupi.

Mencit sudah dikontrol tentang umur mencit, dewasa umur 45-60 hari, jenis kelamin jantan dengan BB 25 – 35 gr. Mencit yang dipersiapkan sejumlah 100 ekor mencit (Smith, 1988), Pada penelitian ini menggunakan “simple random sampling”, dengan cara memberikan nomor 100 ekor mencit & memakai tabel random (Zainuddin, 1988).

Ternyata nomor-nomor yang dipakai adalah : 043, 055, 035, 033, 009, 002 dst, sehingga diperoleh 30 ekor mencit.

Kemudian sampel dikelompokkan menjadi 3 kelompok dengan menggunakan random subyek penelitian/peserta . Kelompok pertama , mencit yang diberi paparan dengan ABS; kelompok kedua , mencit yang diberi paparan dengan LAS dan kelompok ketiga adalah mencit yang diberi Aqua sebagai kelompok kontrol.

4.8 Pemeriksaan respons imun mukosal

Pemeriksaan respon imun mukosal dilakukan pada daerah induktif maupun efektor mukosa pada kedua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol , data yang didapat yaitu data posttest.

Dilakukan pemeriksaan dengan imunohistokimia pada sediaan jaringan segar untuk memeriksa sel T CD₄, pemeriksaan ini dilakukan pada semua kelompok penelitian, dengan menggunakan mikroskop cahaya dan kemudian dihitung limfosit TCD₄. Pemeriksaan imunohistokimia pada sediaan jaringan segar juga untuk limfosit T CD₃ pada semua kelompok penelitian.

Penelitian dengan imunohistokimia dilakukan pada sediaan irisan blok parafin jaringan untuk melihat dan menghitung sel plasma Imunoglobulin A, M & G serta NK sel pada semua kelompok penelitian. Kemudian dilakukan pewarnaan hematoxilin eosin untuk pemeriksaan morfologi jaringan dan makrofag pada semua kelompok penelitian.

4.9 Teknik Analisis Data

Untuk menganalisa data dilakukan langkah sebagai berikut :

4.9.1 Uji Homogenitas

Untuk meyakinkan sampel berasal dari populasi homogen, maka dilakukan uji homogenitas. Variabel yang diuji homogenitasnya adalah berat badan mencit & umur mencit yang menggunakan uji Statistik Anova.

4.9.2 Uji Normalitas

Untuk menguji apakah data dari distribusi normal dilakukan uji normalitas. Variabel yang diuji adalah limfosit T CD₄ Induktif (I); limfosit T CD₈ I, sel NK I; sel Makrofag (MØ) I, SP IgA I; SP IgM I & SP IgG I juga limfosit T CD₄ Efektor (E); limfosit T CD₈ E; sel NK E; sel MØ E; SP IgA E; SP IgM E & SP IgG E dengan menggunakan Frequency Histogram- Kolmogorov dan Normal Probability Plot (Paper). Uji ini dimaksudkan untuk memenuhi prasyarat dilakukannya analisis multivariat (manova).

4.9.3 Uji Konsistensi Pengamatan

Setelah sampel diperiksa oleh pengamat I, segera diberi kode baru, kemudian diberikan pada pengamat II untuk diperiksa ulang. Untuk mengetahui apakah tidak ada perbedaan antara hasil pengamatan peneliti (pengamat I) dan pengamat II, dilakukan uji Konsistensi dengan menggunakan uji Manova. Variabel yang diuji adalah limfosit T CD₄ E; limfosit T CD₈ E, sel NK E; sel MØ E, SP IgA E; SP IgM E, & SP IgG E maupun limfosit T CD₄ I; limfosit T CD₈ I; sel NK I; sel MØ I; SP IgA I; SP Ig M I & SP IgG I.

4.9.4 Uji Perbedaan antara Kelompok Sampel

Untuk menguji adanya perbedaan kelompok yang diberi pemaparan dengan ABS dan kelompok yang diberi pemaparan dengan LAS, dilakukan uji statistik manova .

Pada pengujian perbedaan antara kelompok, data yang diuji adalah perubahan respons imun, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh hasil perlakuan dibandingkan dengan kelompok yang tanpa perlakuan(kelompok kontrol). Variabel yang diuji adalah variabel perubahan respons imun mukosa. Variabel perubahan respons imun mukosa secara fungsional dikelompokkan menjadi kelompok respons imun didaerah induktif mukosa dan respons imun didaerah efektor mukosa.

Variabel yang diuji pada kedua daerah tersebut adalah limfosit T CD₄, limfosit T CD₈; sel NK; sel MØ ; SP IgA ; SP IgM & SP IgG.

4.9.5 Uji Diskriminan

Untuk menguji variabel respons imun mukosa yang merupakan variabel pembeda terkuat dan mendapatkan nilai kontribusi (koefisien Fisher) dilakukan uji diskriminan. Variabel yang diuji pada daerah induktif maupun efektor mukosal adalah : limfosit T CD₄; limfosit T CD₈; sel NK; sel MØ ; SP IgA; SP IgM & SP IgG. Uji ini untuk membuat pola perubahan respons imun mukosal.

4.9.6 Pembuatan Pola respons psikoneuroimunologis

Dilakukan uji statistik manova, untuk mendapatkan kontribusi berdasarkan satu perangkat variabel yang mempunyai nilai beda besar. Pola ini untuk memprediksi aktivitas biologis yang bersama dengan kerangka konseptual digunakan untuk

mengungkap mekanisme modulasi aktifitas sistem imun mukosal akibat paparan ABS dan LAS.

4.9.7 Problem ketepatan pengukuran

Merupakan keadaan yang didambakan dalam penelitian bila setiap pengukuran menghasilkan data yang mencerminkan obyek yang diukur secara tepat, namun kenyataan yang dihadapi tidak semua demikian. Ada dua hal yang berkaitan dengan ketepatan pengukuran, yaitu validitas (derajat kebenaran pengukuran terhadap apa yang seharusnya diukur) dan reliabilitas (konsistensi pengukuran eksternal dan internal). Problem ketepatan pengukuran merupakan hal yang harus dipecahkan untuk mendapatkan kesimpulan dari hasil penelitian yang sah dan handal.

Adapun sumber variasi data dapat berasal dari :

1. perbedaan pada obyek yang diukur;
2. Perbedaan situasi saat pengukuran;
3. Perbedaan alat ukur yang digunakan;
4. Perbedaan cara membaca & melihat hasil pengukuran

Untuk mengatasi problema ketepatan ukuran pada penelitian ini, maka dilakukannya langkah pengaman sebagai berikut :

- a. Mengendalikan beberapa variabel agar sampel homogen variabel yang dikendalikan pada penelitian air antara lain, lokasi dan jenis kelamin.
- b. Menggunakan alat ukur yang sudah ditera dan ajeg. Dalam penelitian ini digunakan mikroskop Nikon, yang dilengkapi dengan graticulae, okuler, mikrometer.

- c. Untuk memperkecil faktor subyektivitas dalam penetapan pola, maka hasil pengamatan peneliti dibandingkan dengan hasil pengamat kedua, yang telah berpengalaman dalam bidangnya. Kemudian hasil pengamatan dilakukan uji keajegan (konsistensi).
- d. Kemampuan pewarnaan HE dan imunohistokimia untuk sediaan blok parafin maupun pewarnaan imunohistokima untuk sediaan jaringan segar diperoleh dengan bekerja di Lab. Gramik Unair. Dengan didampingi konsultan yang berpengalaman dan dimonitor oleh kopromotor sendiri.
- e. Pengolahan Data
Data yang diperoleh dianalisis dengan bantuan komputer AT 486 Dx 2-80 dilengkapi dengan Co processor – program Windows, Program Statistik SPSS/ PC +

B A B 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS****5.1 Hasil Penelitian Kriteria Sampel**

Sampel penelitian adalah mencit putih jantan diambil dari galur BALB/c (Out bred) berumur rata-rata 45-60 hari, pada penelitian ini menggunakan 2 kelompok perlakuan & 1 kelompok kontrol.

P1 : perlakuan dengan pemberian larutan, ABS per-oral.

P2 : perlakuan dengan pemberian larutan, LAS per-oral.

K : kelompok tanpa perlakuan/kontrol , hanya diberi “aqua” saja.

Untuk meyakinkan bahwa semua kelompok anggota sampel diambil dari populasi yang homogen maka terlebih dahulu dikelompokkan sesuai dengan umur (45-60 hari) & berat badan (25-35 gram). Dari 100 ekor mencit diambil secara *simple random sampling* dengan menggunakan tabel random, sebanyak 30 ekor mencit. Secara random subyek penelitian ketiga puluh ekor mencit tadi dibagi 3 kelompok. Kelompok yang diberi paparan ABS sebanyak 10 ekor, kelompok yang diberi paparan LAS 10 ekor dan kelompok yang tidak diberi perlakuan, sebagai kontrol 10 ekor.

5.2 Hasil Uji Statistik Sampel**5.2.1 Uji Homogenitas Sampel**

Untuk meyakinkan kelompok sampel berasal dari populasi homogen secara statistik diuji homogenitas dengan anova. Sampel berat badan mencit diuji menghasilkan koefisien F test dengan signifikansi $\alpha = 0,0537$ atau $\alpha > 0,05$. Pengujian sampel umur

mencit dilakukan dengan uji univariate dengan koefisien F test dengan signifikansi $\alpha = 0,8124$ atau $\alpha > 0,05$. Dan hasil selengkapnya terdapat pada lampiran 2 (2.1 dan 2.2).

Berarti data berat badan dan umur dari sampel benar berasal dari populasi yang homogen.

5.2.2 Hasil Uji Normalitas

Untuk menunjukkan data yang diperoleh berdistribusi normal maka diuji normalitas dengan menggunakan Frequency Histogram Kolmogorov dan Normal Probability Plot (Paper) atau IIDN (*Identic Independency Normality*).

Hasil uji normalitas disajikan pada tabel 1 dan hasil selengkapnya lihat lampiran 3 (3.1 s/d 3.12).

Tabel 1 : Hasil Uji Kolmogorov masing-masing variabel.

Variabel	Nilai Kolmogorov	P
E T CD ₄	0,149609	0,332163
E T CD ₈	0,268008	0,00638928
E NK	0,159793	0,258789
E MØ	0,160774	0,252397
E SP Ig A	0,229596	0,0294808
E SP Ig M	0,174047	0,17712
E SP Ig G	0,254987	0,011017
I T CD ₄	0,251683	0,0125957
I T CD ₈	0,253146	0,0118729
I NK	0,375787	0,0000248139
I MØ	0,117956	0,63387
I SP Ig A	0,28752	0,00268446
I SP Ig M	0,231237	0,0277506
I SP Ig G	0,231037	0,0279566

Melihat grafik pada *frequency histogram* : variabel yang diperoleh sebagian besar mempunyai distribusi normal dan melihat gambaran/grafik dari normal probability plot, data juga berdistribusi normal.

5.2.3 Uji Keajegan/Konsistensi Pengamatan

Untuk menguji apakah pengamatan setiap variabel yang dilakukan peneliti benar, dilakukan uji keajegan terhadap hasil pengamatan yang dilakukan oleh pengamat kedua dengan uji Manova test didapat koefisien F test.

Uji keajegan Pengamat 1 dan Pengamat 2 menggunakan Uji Manova dengan $\alpha = 5\%$ atau 0,5. Didapatkan Sig. of F = 0,996 (Wilks) atau α lebih besar dari 0,05 Berarti pengamat 1 dan pengamat 2 = homogen atau tidak ada perbedaan signifikan lihat lampiran 4 (4.1 s/d 4.5). Sedang Uji Univariate, didapatkan Sig of F = 1,000, atau $> 0,05$. Berarti pengamat 1 dan pengamat 2 homogen juga, hasil uji keajegan pengamat didapat $\alpha > 0,05$ berarti tidak ada perbedaan signifikan antara pengamat 1 dengan pengamat 2 , sehingga data bisa diambil dari pengamat 1 saja. Untuk memperkuat bukti bahwa antara hasil pengamat I dan II datanya layak diuji secara statistik dilakukan uji IIDN (Identic Indipendence Normality) seperti pada lampiran 3 .7 s/d 3 .12.

Identic, dimana variasi data antara kelompok kontrol dan perlakuan bentuknya harus mirip walaupun reratanya berbeda. Indipendence Autocorelation Function, yaitu bahwa waktu pengamatan sampel antara yang pertama dan kedua, kedua dan ketiga dan seterusnya diharapkan tidak ada pengaruh baik dari lokasi, keahlian ataupun maksud-maksud yang lain, ternyata masih berada didalam garis batas. Normality, untuk

pengelompokan data, data berada diantara rerata jadi simpang bakunya tidak melebar/ validitasnya baik.

Tabel 2 : Uji homogenitas Data – Univariate F Test.

Variabel	Area	Pengamat I		Pengamat II		F Test
		Rerata	Simpang baku	Rerata	Simpang baku	
CD ₄	I	1,589	1,000	1,739	1,216	0,462
	E	7,522	4,011	7,800	4,609	0,725
CD ₈	I	1,200	0,525	1,217	0,591	0,872
	E	5,473	2,200	5,528	2,282	0,893
NK	I	1,883	1,814	1,934	1,878	0,881
	E	3,506	1,316	3,383	1,313	0,611
MØ	I	7,428	3,735	7,805	4,041	0,596
	E	9,544	3,028	9,600	3,244	0,923
IgA	I	0,560	0,533	0,594	0,484	0,713
	E	10,089	4,017	10,250	4,151	0,829
IgM	I	0,516	0,474	0,611	0,593	0,333
	E	7,118	4,211	7,405	4,677	0,724
IgG	I	0,406	0,431	0,500	0,493	0,269
	E	5,639	3,230	5,777	3,510	0,822

“ Averaged F test” untuk ke-14 variabel didapatkan Sig of F = 1,000

5.2.4 Hasil Uji Perbedaan Antar Kelompok Sampel

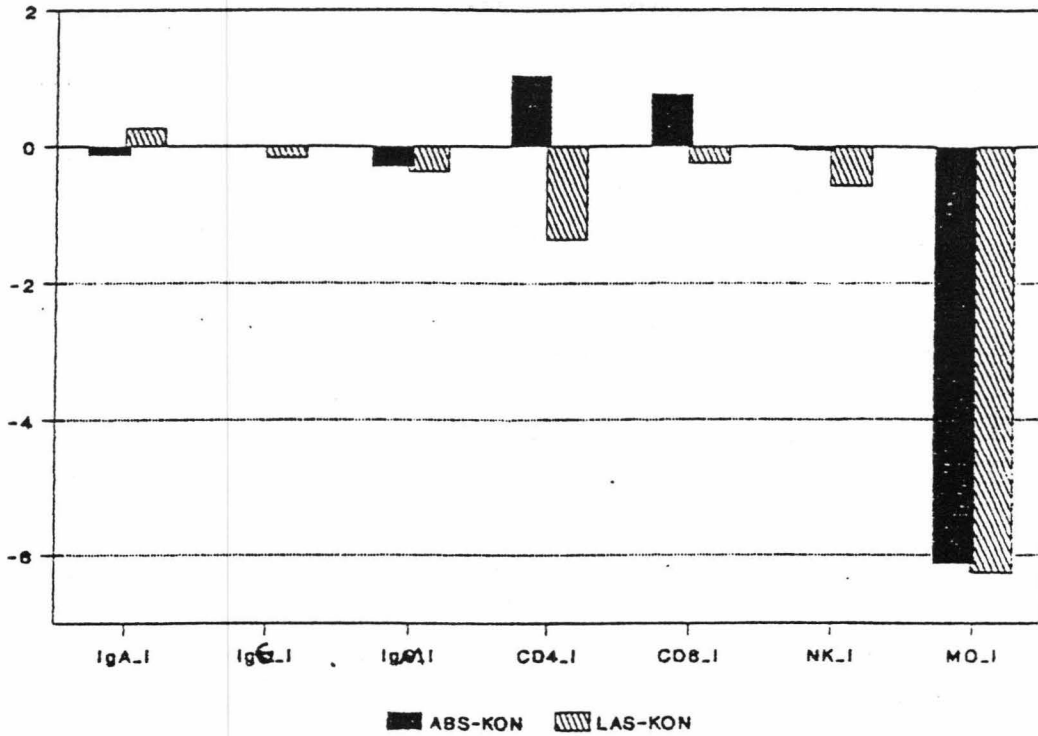
Kegunaan uji perbedaan antar kelompok sampel untuk mengetahui bahwa masing-masing kelompok mencit, yang terpapar ABS; yang terpapar LAS ; dan kontrol adalah berbeda. Variabel yang diuji adalah variabel tergantung, menggunakan uji

statistik multivariate of variance (Manova). Pada pengujian perbedaan antara kelompok, data yang diuji adalah perubahan respon imun. Variabel respons imun mukosa pada usus mencit secara fungsional dikelompokkan menjadi kelompok respons imun daerah induktif mukosa dan respons imun daerah efektor mukosa. Hasil pengujian pada daerah induktif mukosa dengan menampilkan 7 variabel diperoleh F hitung dengan metode Wilks sebesar 0,21662, dengan tingkat signifikansi dari $F = 0,003$ atau $\alpha < 0,05$. Sedangkan hasil pengujian daerah efektor mukosa dengan menampilkan 7 variabel juga diperoleh F hitung dengan metode Wilks sebesar 0,34184 dengan tingkat signifikansi dari $F = 0,034$ atau $\alpha < 0,05$.

Hasil pengujian tersebut diperoleh bahwa ada perbedaan perubahan respons imun mukosal yang signifikan antara kedua grup yaitu grup 1 yang terpapar dengan ABS maupun grup 2 yang terpapar dengan LAS. Hasil lebih lengkap dilihat pada lampiran 5 (5.1 s/d 5.4) dan lampiran 6 (6.1 s/d 6.4).

Tabel 3 : Harga Rerata, Simpang Baku Setiap Variabel Perubahan Psikoneuroimunologis dari 7 Variabel pada daerah Induktif Mukosal.

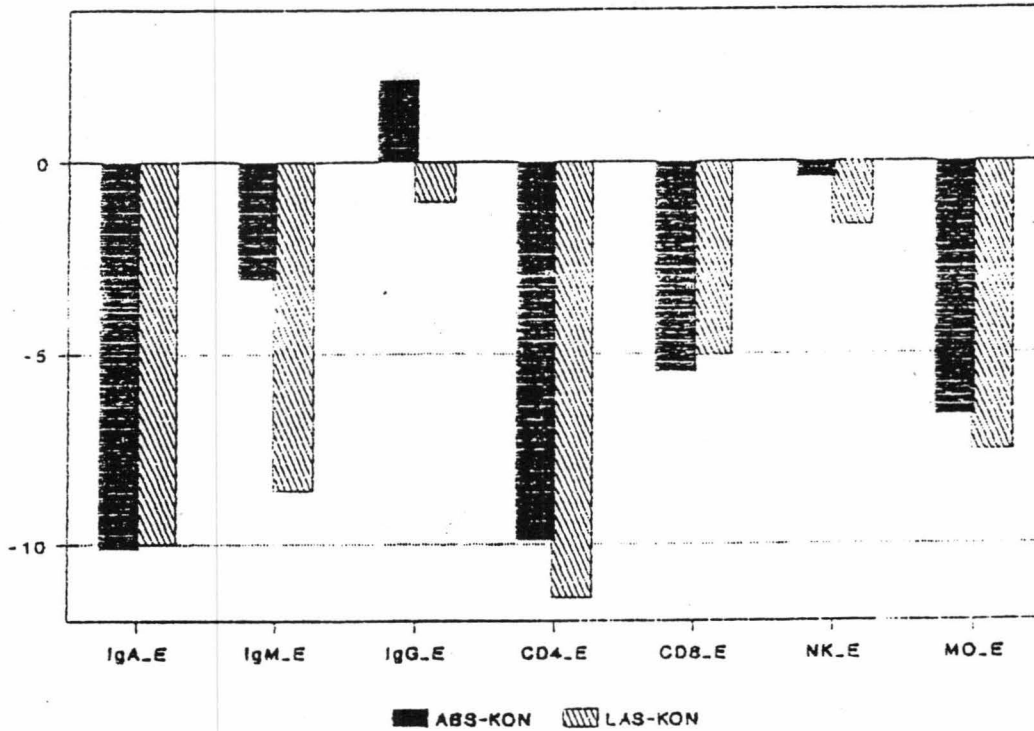
Variabel	Grup 1 (ABS)		Grup 2 (LAS)	
	Rerata	Simpang baku	Rereta	Simpang baku
IgA	-0,134	0,672	0,268	0,814
IgM	-0,300	0,485	-0,367	0,595
IgG	-0,00	0,351	-0,166	0,393
CD4	1,034	0,869	-1,367	1,083
CD8	0,767	0,772	-0,232	0,225
NK	-0,068	0,305	-0,567	0,525
MØ	-6,132	3,375	-6,267	3,478



Gambar 3 : Grafik Rerata setiap variabel perubahan psikoneuroimunologis pada daerah induktif mukosal

Tabel 4 : Harga Rerata, Simpang baku Deviasi Setiap Variabel Psikoneuroimunologis dari 7 Variabel pada daerah Efektor Mukosal.

Variabel	Grup 1 (ABS)		Grup 2 (LAS)	
	Rerata	Simpang baku	Rerata	Simpang baku
IgA	-10,100	1,634	-10,00	1,476
IgM	-3,041	5,915	-8,575	4,624
IgG	2,167	1,793	-1,063	1,041
CD ₄	-9,867	2,698	-11,402	2,733
CD ₈	-5,468	1,467	-5,034	1,536
NK	-0,434	0,847	-1,667	0,970
MØ	-6,633	3,662	-7,533	3,586



Gambar 4 : Grafik Rerata setiap variabel psikoneuroimunologis pada daerah efektor mukosal

5.2.5 Uji Diskriminan Untuk Identifikasi Variabel Pembeda.

Kegunaan uji diskriminan variabel pembeda, untuk menguji setiap variabel respons imun mukosal yang membantu membedakan variabel yang terkuat. Uji statistik yang dipakai analisis diskriminan.

Analisis diskriminan dilakukan pada variabel perubahan respons imun mukosal. Variabel respons imun mukosal secara fungsional dikelompokkan menjadi kelompok respons imun induktif mukosal dan respons imun efektor mukosal. Uji analisis diskriminan terhadap variabel daerah induktif mukosa menampilkan 7 variabel yaitu limfosit T CD_4^+ , limfosit T CD_8^+ , sel NK, sel MØ, SP IgA, SP IgM dan SP IgG didapatkan hasil 5 variabel pembeda terkuat yaitu limfosit T CD_4^+ , limfosit T CD_8^+ , sel

NK, sel MØ, SP IgA dengan koefisien Wilks 0,22358 & tingkat signfikansi $\alpha = 0,0004$ lihat tabel 5.

Tabel 5 : Tabel Rekapitulasi daerah induktif

Action		Vars	Wilks	Sig
Step	Entered Removed	In	Lambda	Sig
1	T CD ₄	1	0,37573	0,00
2	T CD ₈	2	0,27341	0,00
3	NK	3	0,25233	0,00
4	MØ	4	0,23362	0,00
5	SP IgA	5	0,22358	0,00

Bila 5 variabel dipakai bersama memberi kekuatan pembeda sebesar 100 %, begitu juga bila 7 variabel dipakai bersama memberikan kekuatan pembeda 100%.

Hasil lengkap lihat lampiran 7 (7.1 s/d 7.9).

Sedang pada daerah efektor mukosa juga menampilkan 7 variabel yaitu limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, sel MØ, SP IgA, SP IgM dan SP IgG. Dari 7 variabel tersebut juga didapatkan 3 variabel pembeda terkuat yaitu , SP IgA, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺ dengan koefisien Wilks 0,34669 dengan tingkat signifikansi $\alpha = 0,0006$ lihat tabel 6.

Tabel 6 : Tabel rekapitulasi daerah efektor

Action		Vars	Wilk's	
Step	Entered Removed	In	Lambda	Sig
1.	SP IgG	1.	0,42579	0,0001
2.	T CD8	2.	0,37191	0,0002
3.	T CD4	3.	0,34669	0,0006

Bila 3 variabel dipakai bersama memberi kekuatan pembeda sebesar 90 %, begitu juga bila 7 variabel dipakai bersama memberikan kekuatan pembeda sebesar 90 %. Data lengkap lihat lampiran 8 (8.1 s/d 8.13).

5.2.6 Pembuatan pola perubahan respons imun

Dengan memperhatikan konsep PNI (Putra, 1999) maka perubahan biologis yang merugikan pada sistem imun yang berkonsep *stress cell* untuk selanjutnya dalam penelitian ini juga disebut sebagai paradigma PNI, berarti paradigma ini merupakan penjabaran dari paradigma patobiologis pada sistem imun dengan konsep *stress cell* sehingga pola yang terbentuk oleh variabel perubahan imun di mukosa disebut juga sebagai pola PNI di mukosa usus.

Untuk memecahkan masalah dan menjelaskan pola perubahan respons psikoneuroimunologik pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol diperlukan suatu pola. Untuk dapat membuat pola diperlukan harga kontribusi diskriminan setiap komponen psikoneuroimunologik. Pola yang dibuat adalah suatu pola perubahan

respons psikoneuroimunologik mukosa usus. Variabel yang diuji adalah variabel tergantung dengan uji statistik manova.

Pola perubahan respons psikoneuroimunologik mukosa usus terdiri dari pola respons imun daerah induktif mukosa dan daerah efektor mukosa.

Pada daerah induktif mukosa diperoleh koefisien F hitung dengan metode Wilks sebesar 0,031519 dengan taraf signifikansi sebesar 0,003 lihat tabel 7. Sedang pada daerah efektor mukosa juga diperoleh koefisien Wilks sebesar 0,18581 dengan taraf signifikansi sebesar 0,00. Lihat tabel 8.

Hasil pengujian pada daerah induktif mukosa dan efektor mukosa pada semua komponen pola masing-masing perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda secara statistik, lihat lampiran 9 (9.1 dan 9.2) dan lampiran 10 (10.1 dan 10.2).

Tabel 7 : Rerata dan Simpang Baku Diskriminan Variabel Pola Perubahan Psikoneuroimunologis dengan 5 variabel pembeda pada daerah Induktif Mukosal.

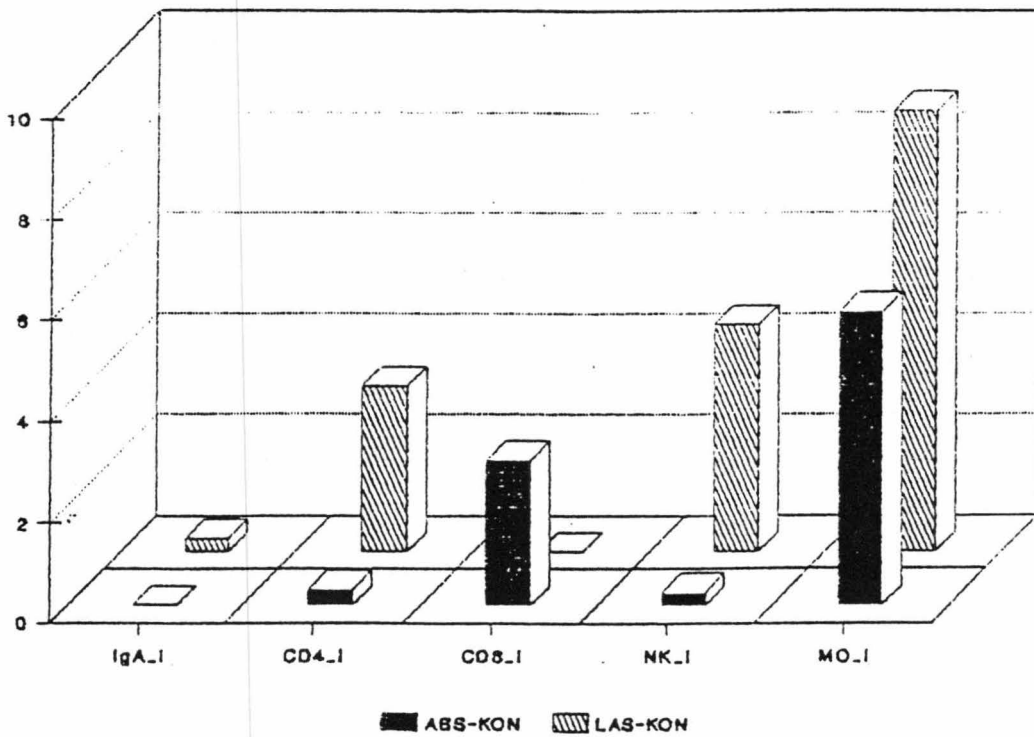
Variabel	Grup 1 (ABS)		Grup 2 (LAS)	
	Rerata	Simpang baku	Rerata	Simpang baku
SP IgA	0,020	0,099	0,271	0,823
T CD ₄	0,314	0,264	3,283	2,600
T CD ₈	2,894	2,913	-0,086	0,083
NK	0,257	1,154	4,506	4,170
MØ	5,820	3,203	8.744	4,853

Keterangan :

Rerata : harga rerata diskriminan untuk setiap komponen pola perubahan respons imun.

Simpang baku : Simpangan baku diskriminan setiap komponen pola perubahan respons imun.

SP IgA, T CD₄, T CD₈, NK & MØ : variabel pembeda terkuat.



Gambar 5 : Grafik pola perubahan respons psikoneuroimunologik daerah induktif mukosal.

Tabel 7 dan gambar 5, menggambarkan pada daerah induktif mukosal bahwa rerata variabel pola perubahan psikoneuroimunologis pada Grup 1 (ABS), SP IgA sangat rendah (0,20) dibanding komponen yang lain dan MØ tertinggi (5,820) dibanding komponen yang lain sedang pada grup 2 (LAS), limfosit T CD₈⁺ terendah (-0,086) sedang MØ tertinggi (8,744) dibanding komponen sistem imun yang lain.

Tabel 8 : Rerata dan Simpang baku Diskriminan Variabel Pola Perubahan Psikoneuroimunologis dengan 3 variabel pembeda pada daerah efektor mukosal.

Variabel	Grup 1 (ABS)		Grup 2 (LAS)	
	Rerata	Simpang baku	Rerata	Simpang baku
SP IgG	4,301	3,559	-0,180	0,176
T CD ₄	9,505	2,599	14,682	3,519
T CD ₈	14,032	3,764	8,028	2,450

Keterangan :

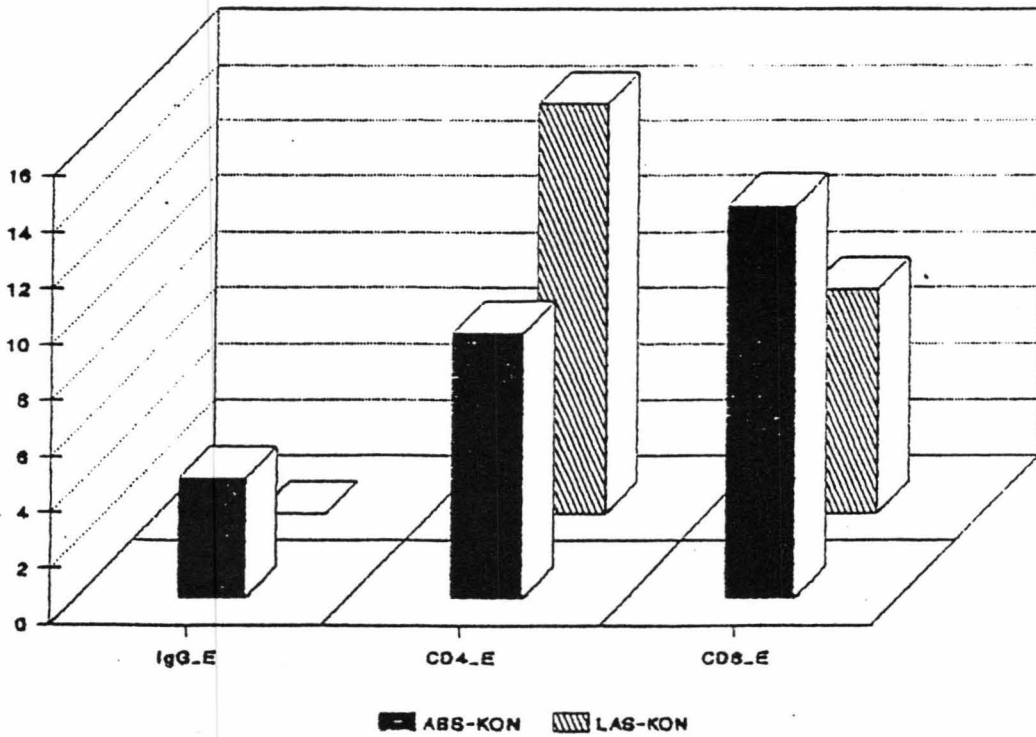
Rerata : harga rerata diskriminan untuk setiap komponen pola perubahan respons imun.

Simpang baku : Simpangan baku diskriminan setiap komponen pola perubahan respons imun.

SP IgG, T CD₄, T CD₈ : Adalah variabel pembeda terkuat.

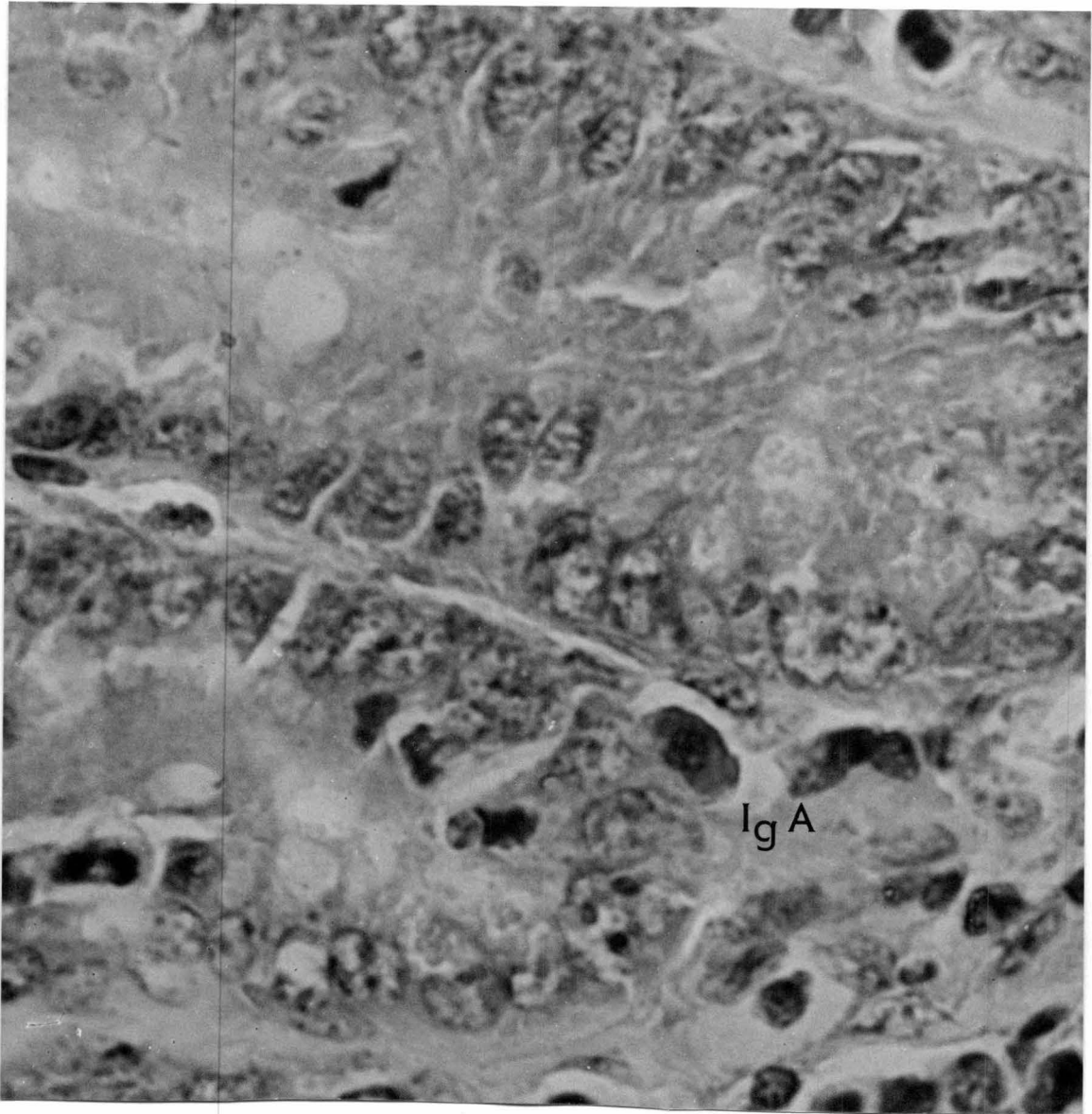
Tabel diatas menggambarkan pada daerah efektor mukosa, pada grup / delta (ABS-Aqua) terdapat kontribusi yang besar pada ketiga variabel pembeda terkuat,

sedang pada grup 2 delta (LAS-Agua) SP IgG terendah (-0,180) dan T CD4 tertinggi (14,682).

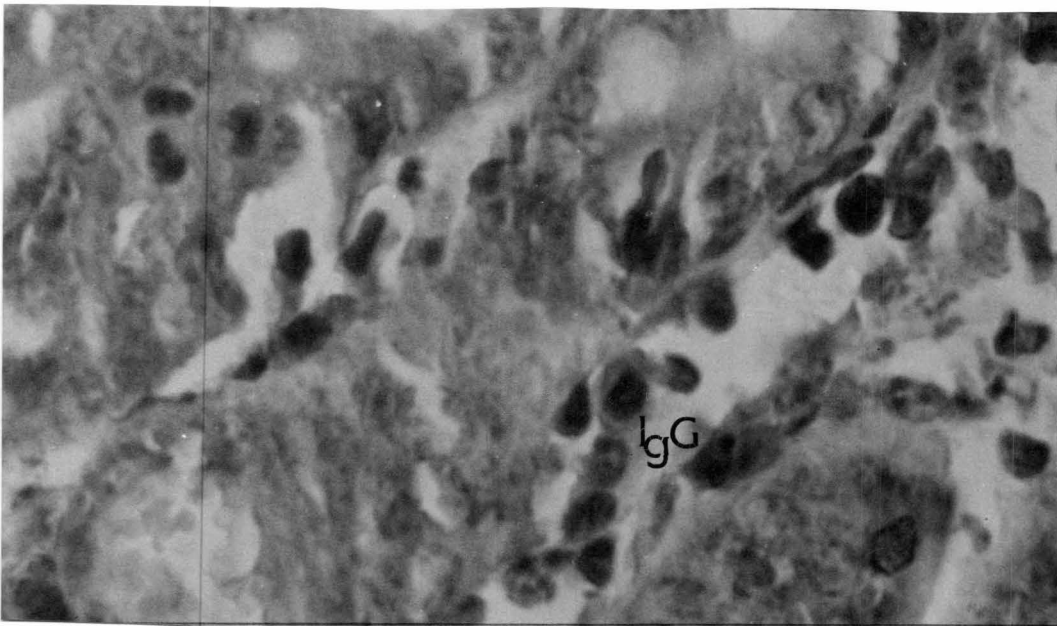


Gambar 6 : Grafik pola perubahan psikoneuroimunologis daerah efektor mukosal.

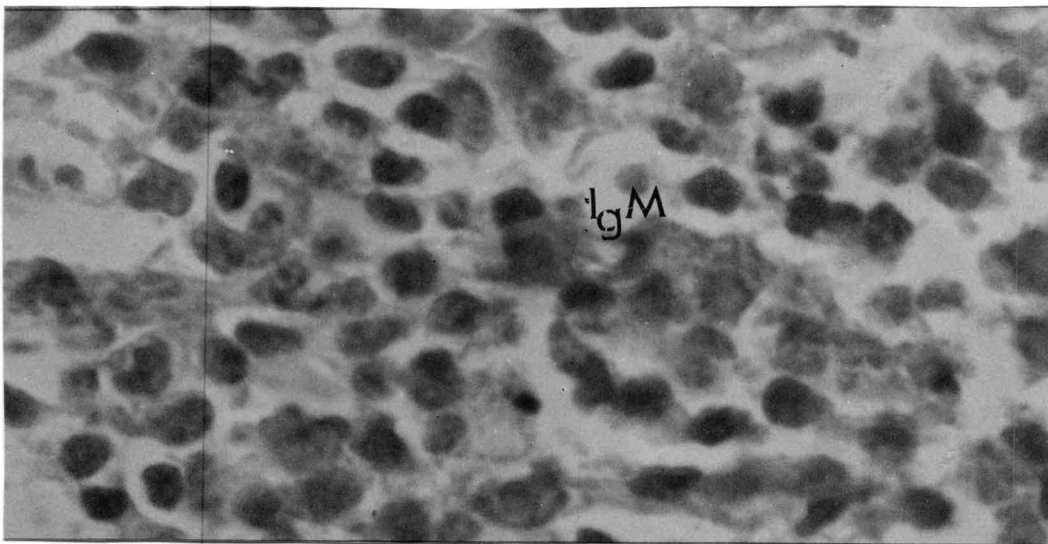
Tabel 8 dan gambar 6 menggambarkan pada daerah efektor mukosal, pada grup 1 (ABS) terdapat kontribusi yang besar pada ketiga variabel pembeda terkuat, sedang pada grup 2 (LAS) SP IgG terendah (-0,180) dan T CD4 tertinggi (14,682).



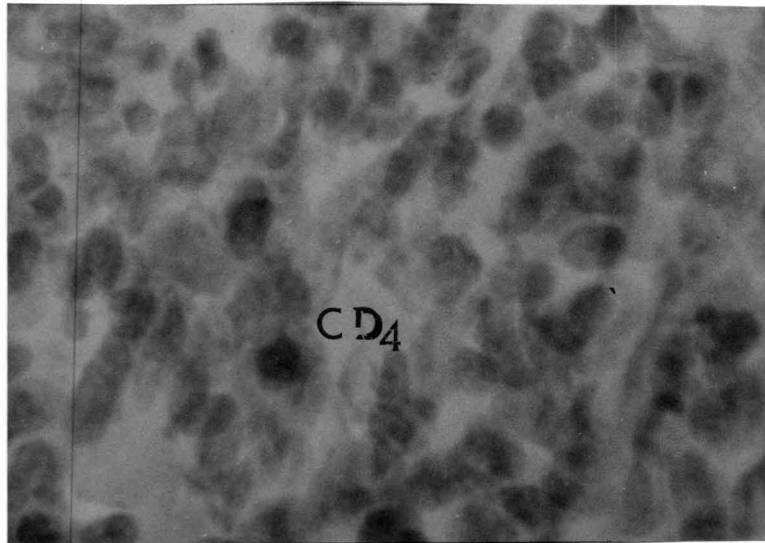
Gambar 7.1 Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian LAS di daerah efektor mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak SPIgA dengan pembesaran 400 kali.



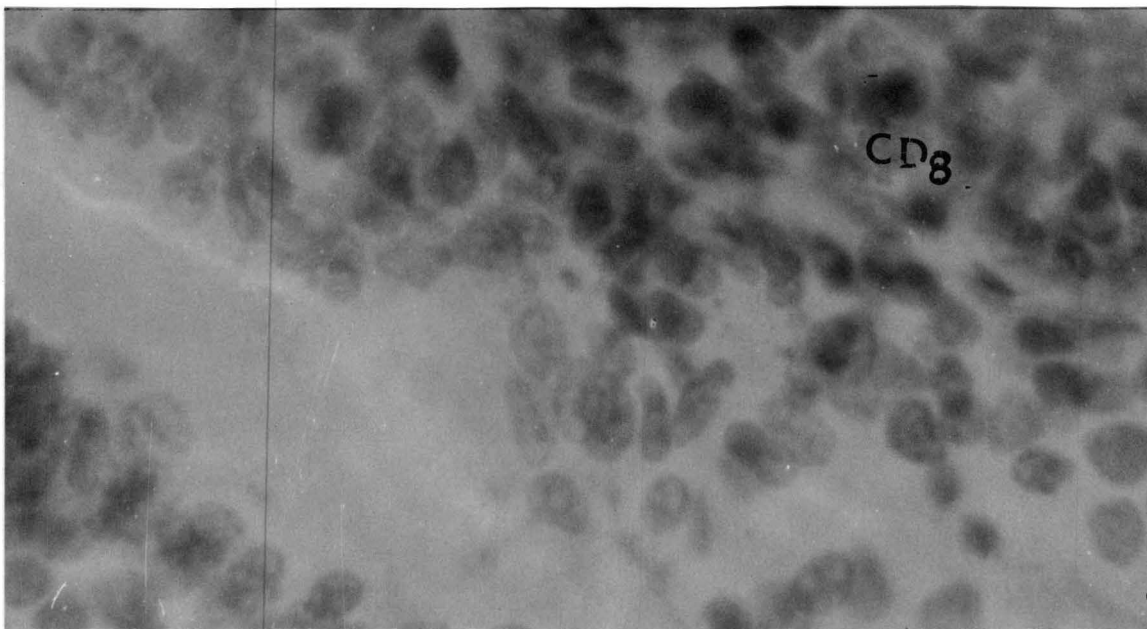
Gambar 7.2 Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah efektor mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak SPIgG dengan pembesaran 400 kali.



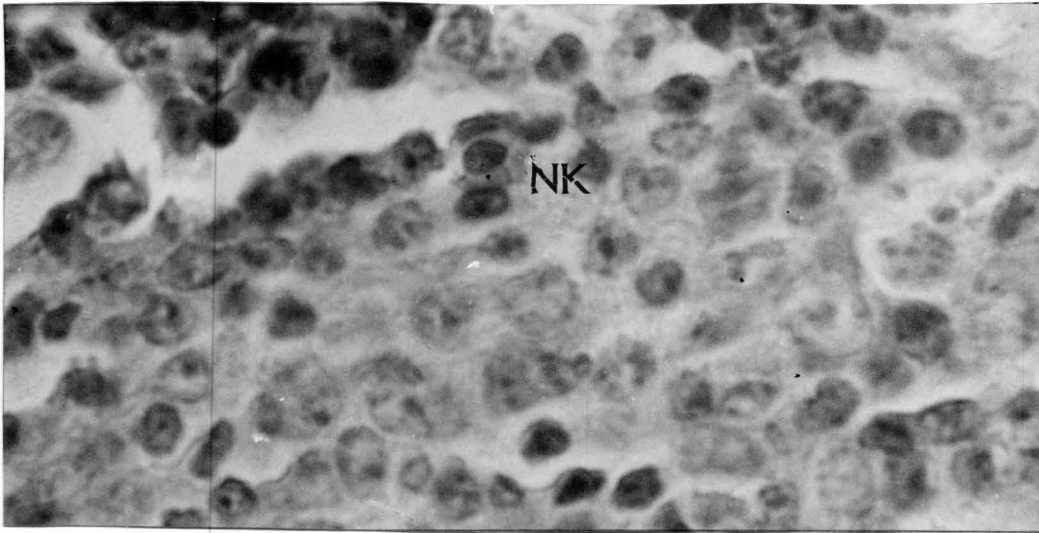
Gambar 7.3 Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah induktif mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak SPIgM dengan pembesaran 400 kali.



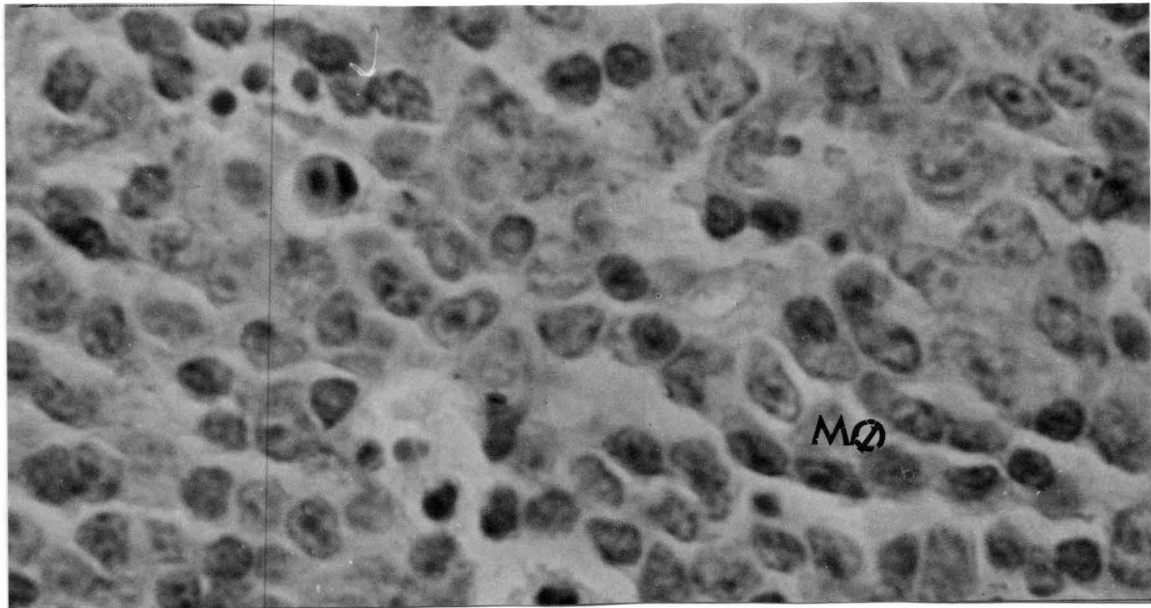
Gambar 7.4 Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah induktif mukosal pada irisan jaringan segar dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak limfosit T $CD4^+$ dengan pembesaran 400 kali.



Gambar 7.5 Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian LAS di daerah efektor mukosal pada irisan jaringan segar dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak limfosit T $CD8^+$ dengan pembesaran 400 kali.



Gambar 7.6 Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian ABS di daerah efektor mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan imuno peroksidase, tampak sel NK dengan pembesaran 400 kali.



Gambar 7.7 Sediaan sampel kelompok mencit pada pemberian LAS di daerah induktif mukosal pada irisan blok parafin dengan pewarnaan hemaktosilin eosin, tampak makrofag dengan pembesaran 400 kali.

B A B 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dirancang untuk membuktikan dan mengungkap mekanisme perubahan respons imun di mukosa usus akibat paparan bahan aktif deterjen (ABS/LAS). Mengingat ABS dan LAS merupakan bahan toksik, maka kedua bahan tersebut akan menimbulkan stres pada sel yang terkait dengan sistem imun di mukosa. Agar dapat menyimpulkan hasil penelitian ini maka digunakan paradigma patobiologis berkonsep pada stress cell.

Penelitian ini merupakan jenis eksplanatif eksperimental dengan rancangan *the posttest-only control group design* yang dilakukan pada mencit. Rancangan tersebut dipilih mengingat untuk mendapatkan unit penelitian sampel tersebut harus dikorbankan. Agar data ini bisa diolah secara multivariat maka dilakukan beberapa uji yaitu uji homogenitas sampel uji normalitas dan uji konsistensi.

Untuk mengetahui pengaruh paparan ABS dan LAS pada respons imun mukosal maka dilakukan uji beda multivariat (manova). Sedangkan untuk mengetahui besar kontribusi dari setiap variabel yang terkait dengan perubahan respons imun mukosa usus yang terpapar dengan ABS/LAS dilakukan analisis diskriminan. Salah satu fungsi analisis diskriminan adalah untuk melihat besar kontribusi variabel pada aktifitas biologisnya, yang dalam penelitian ini hasil tersebut dipolakan (Pola perubahan PNI).

Penelitian mengenai ABS/LAS yang sudah dilakukan oleh peneliti terdahulu sejauh ini belum pernah mengungkap pengaruh lokal didalam tubuh akibat paparan ABS/LAS ini. ABS/LAS merupakan agen senobiotik yang toksis merupakan *stressor* , dapat menyebabkan stres pada sel epitel mukosa dan sel M mukosa usus yang mana kedua sel ini mempunyai peran pada sistem imun mukosal sehingga fungsi sistem imun mukosal ini akan mengalami modulasi.

Sistem imun mukosal merupakan pertahanan pertama terhadap imunogen atau patogen yang masuk tubuh per-oral, sehingga perubahan sistem imun lokal ini segera tampak ketika imunogen atau patogen tersebut melukai mukosa usus.

Dusahakan untuk menjaga validitas external dan internal sebaik-baiknya, supaya penelitian ini tetap sah. Pengontrolan validitas eksternal dengan cara randomisasi dan menghomogenitaskan sampel. Randomisasi menggunakan cara “sampel acak sistematis”, yaitu dari 100 mencit jantan umur 45 sampai 60 hari, dengan berat badan 25 sampai dengan 35 gram, diambil 30 ekor mencit. Dari 30 mencit ini, 10 mencit diberi paparan ABS, 10 mencit diberi paparan LAS, dan 10 mencit tidak diberi perlakuan atau sebagai kontrol dengan pemberian Aqua.

Untuk homogenitas sampel dilakukan uji statistik manova, ternyata sampel berasal dari populasi yang homogen. Untuk mengetahui sampel berasal dari distribusi normal dilakukan uji statistik normalitas, ternyata berdistribusi normal.

Dosis perlakuan untuk masing-masing kelompok sama, baik larutan ABS, larutan LAS, maupun Aqua untuk kontrol yaitu 0,1 cc setiap mencit. Pemberian secara oral dilakukan selama 7 hari beturut-turut setiap pagi hari, setelah selesai pada hari ke 8 mencit dimatikan, diambil usus halus beserta *Peyer Patches* nya. Kemudian organ tadi

dibagi dua, sebagian untuk sediaan jaringan blok parafin, sebagian untuk sediaan jaringan segar.

Perbedaan respons imun mukosal atas dasar analisis multivariat yang diwujudkan dalam bentuk pola perubahan respons imun mukosal (PPRIM) dengan menggunakan konsep PNI pada sel yang mengalami stres.

Semua variabel penelitian ini bersumber pada konsep psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres. Pengempirian variabel menjadi data digunakan untuk pemeriksaan morfofungsi yaitu melihat morfologi sel yang sedang berfungsi.

Pemrosesan jaringan dilakukan oleh peneliti dibantu oleh teknisi yang ahli dibidangnya dan diawasi oleh seorang ahli patobiologi (Patobiolog). Untuk pengamatan komponen imunoglobulin yang tidak mudah rusak dapat digunakan pemrosesan jaringan dengan metode parafin. Sedang untuk pengamatan limfosit T CD₄ dan limfosit T CD₈ yang mudah rusak dilakukan pemrosesan jaringan segar dengan metode pembekuan.

Penetapan lokasi pengamatan dilakukan oleh peneliti sebagai pengamat pertama bersama dengan pengamat kedua. Dengan harapan dapat mengurangi kemungkinan adanya perbedaan hasil pengamatan yang diakibatkan oleh perbedaan lokasi pengamatan. Disamping itu bila diperlukan penghitungan ulang, tidak akan mengubah lokasi penghitungan.

Pengamatan komponen sistem imun dilakukan dengan menggunakan alat yang sudah ditera ajeg. Dalam penelitian ini digunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan graticulae untuk memudahkan penghitungan komponen yang diamati. Untuk menguji apakah pengamatan setiap variabel yang dilakukan peneliti sudah benar maka

dilakukan uji Manova. Semua variabel respons imun bekerja dalam satu fungsi, maka teknik analisis yang digunakan adalah analisis multivariat.

Pemecahan masalah penelitian diperlukan suatu model terpikir (paradigma). Paradigma patobiologik pada hakekatnya merupakan model berpikir untuk menalar segala perubahan biologik yang tidak normal yang terjadi karena tubuh berinteraksi dengan lingkungan yang merusak. Penerapan paradigma untuk memecahkan masalah penelitian perlu ditetapkan suatu kerangka pikir atau konsep. Sehingga indikator yang ditetapkan merupakan cerminan dari suatu konsep yang digunakan dan diharapkan dapat untuk menajamkan hasil penelitian (Pujirahardjo, 1993). Atas dasar hal tersebut maka dalam penelitian ini digunakan konsep psikoneuroimunologis pada sel yang mengalami stres.

Bentuk interaksi variabel psikoneuroimunologis tersebut digambarkan sebagai pola. Pola psikoneuroimunologis pada hakekatnya merupakan pencerminan interaksi antara fungsi semua komponen yang terlibat dalam kelainan respon imun. Karena itu pola ini tidak cukup dicerminkan secara langsung dari besaran atau harga rata-rata masing-masing komponen, mengingat harga dari masing-masing komponen tersebut belum mencerminkan interaksi biologik yang terjadi. Untuk membuat pola psikoneuroimunologis dari hasil penelitian ini, dilakukan perkalian harga rata-rata dari variabel pembeda tersebut dengan suatu konstanta yaitu koefisien Fisher yang merupakan interaksi dari bermacam variabel dan mencerminkan besarnya peran dan kontribusi antar variabel dalam mekanisme biologik yang terjadi. Untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok ABS, LAS dan kelompok kontrol dilakukan uji

Manova. Ternyata ada perbedaan perubahan respons PNI yang signifikan antara grup yang terpapar dengan ABS dengan grup yang terpapar dengan LAS.

Untuk mengetahui variabel pembeda yang sangat menentukan atau pembeda terkuat diantara ke 2 grup tersebut dilakukan uji analisis diskriminan. Uji analisis diskriminan pada daerah induktif mukosal didapat 5 variabel pembeda terkuat yaitu limfosit T CD_4^+ , limfosit T CD_8^+ , sel NK, sel MØ dan SP IgA dengan kekuatan pembeda sebesar 100 %. Sedang daerah efektor mukosal didapat 3 variabel pembeda terkuat yaitu : SP IgG, limfosit T CD_4^+ dan limfosit T CD_8^+ dengan kekuatan pembeda sebesar 90 %.

Agar variabel tersebut dapat mencerminkan pola perubahan respons psikoneuroimunologik diputuskan untuk membuat pola sebagai berikut : Pola dari perubahan respons imun mukosal (\blacktriangle),

yang dipolakan adalah :

1. Perubahan respons imun antara ABS (A) dengan Aqua (K)

A - K \longrightarrow \blacktriangle :

A : bahan toxis yang sebenarnya dilarang.

2. Perubahan respons imun antara LAS (L) dengan Aqua (K)

L - K \longrightarrow \blacktriangle :

L: bahan toxis yang bisa ditolerir.

Dari sini diharapkan akan bisa mengungkap mekanisme dari perubahan respons imun akibat *stressor* dengan pendekatan psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres.

Pembuatan pola perubahan psikoneuroimunologik daerah induktif mukosal dengan menggunakan 5 komponen psikoneuroimunologik yaitu limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, sel MØ dan SP IgA. Sedangkan pembuatan pola perubahan psikoneuroimunologik daerah efektor mukosal menggunakan 3 komponen psikoneuroimunologik yaitu SP IgG, limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺.

Uji analisis diskriminan juga menghasilkan harga kontribusi diskriminan setiap komponen variabel yang digunakan untuk membuat pola perubahan respons psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres.

Pola perubahan psikoneuroimunologis yang dibahas adalah pola pada daerah induktif mukosa usus dan daerah efektor mukosa usus. Pola ini diharapkan dapat menjelaskan proses kejadian mengapa pemberian paparan deterjen merubah respons imun mukosal. Dengan menganalisa PPRIM diharapkan bisa mengungkap mekanisme dari perubahan psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres.

Pada penelitian ini digunakan istilah komponen imun seluler atau imunitas seluler dan komponen imun humoral atau imunitas humoral, sehubungan dengan konsep PNI yang berprinsip pada modulasi aktifitas sistem imun terhadap *stressor*. Modulasi/perubahan aktifitas sistem imun terjadi pada setiap variabel komponen sistem imun, dan diduga merupakan *General Adaptation Syndrome* (GAS). Bentuk imunitas humoral dan seluler ini merupakan bentuk respons imun adaptif (adaptasi, dan kegagalan dari adaptasi ini menimbulkan modulasi aktifitas sistem imun berupa respons imun yang

dicerminikan oleh GAS dengan melalui tingkatan sebagai berikut : (1). *Alarm stage* , (2). *Resistance/adaptation stage* dan (3). *Exhaustion stage*. (Mc Cance, 1994).

TABULASI DATA

VARIABEL	A B S INDUKTIF MUKOSAL			L A S INDUKTIF MUKOSAL		
	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN
IgA	-0,134	-0,147	0,020	0,268	1,011	0,271
IgM	-0,300	-	-	-0,367	-	-
IgG	0,00	-	-	-0,166	-	-
CD4	1,034	0,303	0,314	-1,367	-2,401	3,283
CD8	0,767	3,773	2,894	-0,232	0,369	-0,086
NK	-0,068	-3,779	0,257	-0,567	-7,946	4,506
MØ	-6,132	-0,949	5,820	-6,267	-395	8,744

VARIABEL	A B S EFEKTOR MUKOSAL			L A S EFEKTOR MUKOSAL		
	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN
IgA	-10,100	-	-	-10,00	-	-
IgM	-3,041	-	-	-8,575	-	-
IgG	2,167	1,984	4,301	-1,363	0,169	-0,180
CD4	-9,867	-0,963	9,505	-11,402	-1,287	14,682
CD8	-5,468	-2,566	14,032	-5,034	-1,594	8,028
NK	-0,434	-	-	-1,667	-	-
MØ	-6,633	-	-	-7,533	-	-

Paparan ABS dan LAS pada sistem imun mukosal dapat diamati pada 2 daerah yaitu daerah induktif dan daerah efektor. Perubahan daerah induktif mukosal lebih mencerminkan proses inisiasi/induksi dari sistem imun, sedang perubahan pada daerah efektor mukosal lebih mencerminkan bentuk efektifitas sistem imun mukosal (Stites,

1991; Hiroshi, 1994) seperti telah dilaporkan banyak peneliti bahwa ketahanan imunologis dimukosa didominasi oleh peran sekretori IgA walaupun tidak menutup kemungkinan peran CMI yang ada di mukosal. Hal ini didasarkan atas pertimbangan bahwa ketahanan imunologis yang ada di permukaan mukosa usus adalah S IgA (Tomasi, 1982; Ogra, 1994).

Kerangka konseptual yang digunakan menyatakan bahwa ABS/LAS sebagai *stressor* mempunyai zat aktif permukaan (surfaktan) dengan kedua kutub hidrofilik dan lipofiliknya akan merusak membran lipid bilayer dari sel M maupun sel epitel mukosal, hal ini akan menyebabkan masuknya imunogen yang tidak terbatas dan kemudian akan diterima oleh sel MØ atau sel NK pada area Dome, sehingga sel NK dan MØ ini juga akan mengalami stres.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan ABS di induktif mukosal menyebabkan penurunan SP IgA, SP IgM, sel NK dan MØ seperti terlihat pada analisis manova (Tabel 3). Dilihat dari mekanisme kerja biologiknya pada analisis diskriminan ternyata memberikan kontribusi peran yang positif pada semua komponen yang mempunyai nilai beda tinggi yaitu SP IgA, limfosit T CD_4^+ , limfosit T CD_8^+ , sel NK dan MØ (Tabel 5).

IL-1 yang dihasilkan oleh NK dan MØ yang stres akan memicu limfosit T CD_4^+ . Peningkatan Th-1 relatif lebih mendominasi pemicuan limfosit T CD_4^+ dibandingkan dengan peningkatan Th-2 sehingga karena pengaruh IL-2 yang dihasilkan oleh Th-1 terjadi pemicuan untuk limfosit T CD_8^+ . (Bradley, 1996). Th-2 mungkin meningkat pada pemicuan limfosit T CD_4^+ , dan terbentuk antibodi dimana diduga yang banyak adalah SP IgD sebagai imunoglobulin awal pada proses inisiasi untuk maturasi

imunoglobulin. Oleh karena suatu sebab SP IgD ini belum sampai bisa berubah menjadi SP IgA maupun SP IgM, sehingga SP IgA dan SP IgM ini negatif atau terjadi penekanan. Switching dari SP IgG tidak mungkin terjadi karena SP IgG = 0,00.

NK dan MØ tertekan, ini dapat dijelaskan bahwa diduga keduanya banyak yang rusak oleh karena toksisitas ABS ataupun untuk menanggulangi imunogen lain yang masuk pada area Dome induktif mukosal. Koefisien Fisher untuk NK negatif, MØ juga negatif ini menunjukkan penurunan aktifitas biologik keduanya pada daerah induktif mukosal. Analisis diskriminan untuk NK dan MØ positif yang berarti peran kontribusi di dalam pola sebagai variabel pembeda adalah besar, tetapi nilai ini sebenarnya jauh lebih rendah dibandingkan dengan bila tidak diberi paparan ABS, ini menunjukkan adanya penurunan aktifitas biologis.

Limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺ terpicu, serta peran kontribusinya juga positif ini disebabkan pemicuan limfosit T CD₄⁺ oleh IL-1 didominasi oleh Th-2 tetapi ternyata Th-1 relatif lebih meningkat dibandingkan dengan Th-2, sehingga limfosit T CD₈⁺ juga meningkat.

Sedang paparan ABS di daerah efektor mukosal ternyata menekan hampir semua komponen sistem imun SP IgA, SP IgM, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK dan MØ, kecuali SP IgG, bisa dilihat dari analisis manovanya (Tabel 3).

Epitel mukosal yang mengalami stres ini akan memproduksi IL-1 dengan sangat berlebihan sehingga justru akan menekan T CD4. Penurunan T CD4 ini akan mempengaruhi penurunan subsetnya juga yaitu Th-1 dan Th-2. Penurunan Th-2 mempengaruhi produksi antibodi, disini terjadi penurunan IgA dan IgM, sedang IgG positif yang dimungkinkan karena terjadinya proses inflamasi akibat toksisitas dari ABS,

sehingga IgG meningkat. Penurunan sel Th-1 mempengaruhi terjadinya penurunan pada limfosit T CD₈⁺. Kontribusi IgG memang berlawanan dengan IgA, dimana peran kontribusi SP IgA di dalam pola tidak ada sehingga IgG berkontribusi positif dengan koefisien Fisher yang positif pula, ini menunjukkan *rearrangement* gen antara IgA dan IgG masih berlaku (Ogra, 1994). Sedang penekanan NK dan MØ, keduanya tertekan terkena langsung oleh toksisitas ABS selain itu juga karena pengaruh masuknya imunogen yang tak terbatas akibat kerusakan epitel mukosal, karena stres.

Pada analisis diskriminan limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺ ini positif tetapi aktifitas biologisnya negatif (koefisien Fisher negatif). Kontribusi di dalam pola menunjukkan peran kontribusi variabel pembeda pada kedua perlakuan adalah positif, tetapi sebenarnya nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan seandainya tidak diberi paparan ABS.

Hasil penelitian pada paparan LAS di induktif mukosal menunjukkan efek penekanan pada setiap komponen sistem imun (SP IgM, SP IgG, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, dan sel MØ kecuali SP IgA, seperti terlihat analisis manova (Tabel 3).

Kalau dilihat dari mekanisme kerja (*action*) biologisnya, ternyata memberikan kontribusi peran yang positif pada SP IgA, limfosit T CD₄⁺, sel NK dan MØ kecuali pada komponen sitotoksik limfosit T CD₈⁺. Padahal komponen seluler CD8 ini berguna untuk fungsi proteksi pada sistem imun mukosal, sehingga fungsi CD8 ini digantikan oleh komponen seluler yang mempunyai fungsi yang sama yaitu sel NK, sehingga kontribusi peran sel NK oleh pengaruh LAS pada daerah induktif ini cukup besar,

dibandingkan dengan sel NK karena pengaruh ABS, seperti terlihat pada analisis diskriminan (Tabel 5).

Sedang paparan LAS di daerah efektor mukosal menunjukkan bahwa pada daerah efektor mukosal sel yang mengalami stres adalah epitel mukosa yang juga bisa berlaku seperti $M\emptyset$ dan akan menghasilkan IL-1 yang akan mempengaruhi limfosit T helper (limfosit T CD_4^+) dan subsetnya yaitu perbandingan relatif antara Th-1 dan Th-2.

Produksi IL-1 oleh karena kerusakan epitel yang terjadi ini sangat berlebihan sehingga efeknya malahan menekan limfosit T CD_4^+ dimana penurunan ini mengenai kedua subset T helper yaitu Th-1 dan Th-2. Penurunan relatif sel Th-2 akan mempengaruhi produksi antibodi, sehingga SP IgA, SP IgM dan SP IgG juga negatif. Penurunan relatif sel Th-1 akan mempengaruhi sel limfosit T CD_8^+ sehingga limfosit T CD_8^+ juga negatif.

Paparan LAS pada daerah efektor mukosal, ternyata mensupresi semua komponen sel imun baik humoral maupun seluler SP IgA, SP IgM, SP IgG, limfosit T CD_4^+ , limfosit T CD_8^+ , sel NK, dan $M\emptyset$, seperti tercantum pada analisa manova (Tabel 4). SP IgA pada daerah efektor ini negatif walaupun SP IgA pada daerah induktif positif. Ini dimungkinkan karena pada daerah induktif mukosal SP IgA yang diamati adalah merupakan IgA sitoplasmik yang setelah masuk ke daerah efektor, IgA tadi segera disekresikan dan berikatan dengan komponen sekretorik menjadi S IgA untuk melakukan fungsi proteksi mukosal. Jadi SP IgA pada efektor negatif.

Sedang NK dan $M\emptyset$ keduanya tertekan karena terkena langsung oleh pengaruh toksisitas LAS selain itu juga karena pengaruh masuknya imunogen yang tak terbatas akibat kerusakan epitel mukosal, karena stres.

Pada analisis diskriminan limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺ ini positif tetapi aktifitas biologisnya negatif (koefisien Fisher negatif). Kontribusi di dalam pola menunjukkan peran kontribusi variabel pembeda pada kedua perlakuan adalah positif, tetapi sebenarnya nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan seandainya tidak diberi paparan LAS.

Dengan mencermati kontribusi variabel terhadap aktifitas biologisnya maka tampak bahwa paparan ABS induktif mukosal lebih menekan SP IgA, limfosit CD4, NK dan MØ dibanding dengan LAS. Walaupun peran sitotoksik pada CD8 relatif lebih baik dibanding dengan kelompok LAS (Grafik 3). Melihat kontribusi variabel terhadap aktifitas biologisnya maka kelompok ABS pada efektor mukosal lebih menekan CD4 dibanding dengan LAS namun tidak demikian halnya dengan CD8 dan SP IgG (Grafik 4). Dengan memperhatikan kedua pola tersebut kita bisa mencoba mengembangkan pemikiran bahwa ABS lebih merusak SP IgA di induktif mukosal, sehingga fungsi SP IgA pada daerah efektor tidak dapat diperhitungkan kontribusinya. Sebagai gantinya pada pola efektor mukosal yang muncul adalah SP IgG. Sesuai dengan pendapat Ogra, 1994 maka bila SP IgA menurun akan diikuti peningkatan SP IgG namun kondisi ini tidak menguntungkan sistem imunitas mukosal. Selanjutnya dengan memperhatikan imunitas seluler di mukosal maka paparan ABS di induktif mukosal dapat memicu limfosit T sitotoksik namun menekan MØ (Grafik 3). Demikian halnya imunitas seluler kelompok ABS di efektor mukosal justru memicu SP IgG. Selanjutnya bila mencermati imunitas seluler maka kontribusi CD8 untuk kelompok ABS relatif masih lebih baik dibanding kelompok LAS (Tabel 6).

Kesimpulan

Dengan memperhatikan berbagai variabel baik humoral maupun seluler pada daerah induktif mukosal dan daerah efektor mukosal maka dapat disimpulkan bahwa paparan ABS ternyata lebih merusak SP IgA di induktif mukosal, sehingga peran IgA di efektor mukosal menjadi terabaikan. Mengingat imunitas pada permukaan mukosa didominasi oleh SP IgA maka ABS sangat merugikan sistem imunitas di mukosa usus, sedangkan di dalam mukosa ABS relatif tidak terlalu merugikan imunitas seluler.

Keterbatasan penelitian

Tanpa bermaksud mengurangi validitas penelitian ini, maka peneliti sadar bahwa banyak kekurangan yang terjadi misalnya belum ditelitinya substansi yang dikeluarkan oleh yang mengalami stres (stress signaling substances) antara lain pemeriksaan interleukin (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, dan IL-10) dan IFN γ serta pemeriksaan subset dari limfosit T helper yaitu Th-1 dan Th-2. Hal tersebut karena kesulitan untuk “mendapatkan antibodi monoklonal”. Namun berdasarkan kerangka konseptual pada halaman 6, maka keterbatasan ini bisa sedikit berkurang artinya.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

1. Perilaku ABS/LAS sebagai stressor merupakan stres terhadap sel M dan sel epitel mukosal, yang dapat menimbulkan perubahan respons imun mukosal.
2. Paradigma patobiologis yang berkonsep *stress cell* (Paradigma PNI) dapat digunakan untuk membuktikan dan mengungkap perubahan aktifitas sistem imun yang terpapar oleh ABS dan LAS.
3. Pola perubahan respons imun daerah induktif mukosal yang terjadi berbeda dengan daerah efektor mukosa usus mencit.
4. Pemberian ABS/LAS per-oral pada usus mencit akan memodulasi aktifitas sistem imun mukosal yang terjadi.
5. Pemberian ABS per-oral pada daerah induktif mukosa usus mencit, terjadi penekanan pada imunitas humoral yang ditunjukkan oleh penekanan pada SP IgA, sedang pada efektor mukosal terjadi penekanan pada imunitas humoral maupun imunitas seluler yang terlihat pada penurunan untuk semua komponen sistem imun.
6. Pemberian LAS per-oral pada daerah induktif mukosal menekan imunitas seluler yang dijelaskan oleh penekanan pada limfosit T CD₈⁺ sedang pada daerah efektor mukosal terjadi penekanan pada respons imunitas humoral maupun imunitas seluler yang ditunjukkan oleh penekanan pada semua komponen sistem imun.

2. Saran

1. Pada penelitian selanjutnya paradigma patobiologis dengan konsep *stress cell* bisa disebut sebagai paradigma PNI.
2. Mengingat bahwa ABS/LAS banyak terdapat banyak didalam produk rumah tangga selain deterjen maka ada baiknya bahan-bahan tersebut juga diteliti dengan menggunakan paradigma PNI.
3. Bila ada keinginan mengungkap lebih mendalam terhadap perubahan respons imun karena *stress cell* maka bisa dikembangkan penelitian terhadap bahan yang dikeluarkan oleh sel yang mengalami stres (*Stress Signaling Substances*).
4. Perlu dipikirkan pengembangan konsep PNI untuk diberlakukan pada model modulasi aktifitas sistem imun sebagai akibat *immunocompetence cell* yang mengalami stres.
5. Mengganti bahan baku deterjen ABS yang *non biodegradable* dengan LAS yang *biodegradable* supaya pemaparan ABS per-oral berkurang disertai usaha penyediaan bahan LAS tersebut menjadi murah dan mudah mendapatkannya.
6. Lebih memasyarakatnya pengetahuan tentang bagaimana bahayanya ABS dalam deterjen yang dikonsumsi dalam bentuk apapun (bahan pencuci alat-alat rumah tangga, pasta gigi, shampo, kosmetika dll.), melalui gambar maupun tulisan dalam media masa serta melalui penyuluhan kesehatan secara langsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Paber JS, 1991. Cellular and Molecular Immunology, WB. Saunders Company, : 225-283.
- Abbas AK, Lichtman AH, Paber JS, 1994. Cellular and Molecular Immunology Philadelphia, WB Saunders Company: 237-294.
- Ader R and Cohen N, 1991. The Influence of Conditioning On Immune Responses. In (Ader R, et al, eds). Psychoneuroimmunology. 2nd edition. San Diego: Academic Press Inc, pp 611.
- Anonim, 1991. Final report to: The soap and Detergent Association. 475 Park Avenue South New York, NY 10016.
- Applequist D, De Puy C and Rine Hart KL, 1982 Introduction to Organic Chemistry. John Wiley & Sons Inc., New York : 11-19.
- Ariens EJ, Mutschler E and AM Simonis. 1986. Pengantar Toksikologi Umum. Gadjah Mada University Press. P. 38-43.
- Artman NR. 1982. Safety Consideration for Detergents. Water Research. 3:277 – 284
- Atherrya BH, Pletcher J, Zulian F, Weiner DB, and Williams WV, 1993. Clin Immun And Immunophat; Vol. 66 No. 3: 201-211.
- Atlas RD, 1990 Microbiology Fundamental and Application Second Edition. Mac Millan Publishing Company. New York : 456-457
- Baltrusch HJ. Stigel W, and Titze I. 1991. Stress Cancer and Immunity, New Developments In Biopsychosocial And Psychoneuroimmunologic Research. Acta-Neurol (Napoli) 13(4) : 315-27.
- Basedowsky OH, 1992. Introduction : Psychoneuroimmunologyan Overview. In (Schmoll HJ, eds). Psychoneuroimmunology. Lewiston : Hogrefe and Huber Publishers, pp 13-16.
- Bellanti JA, 1985. Immunology III. Philadelphia : WB Saunders Co.: 1-15.
- Berke G. 1989. Function and Mechanism of lysis induced by cytotoxic T Lymphocyte and Natural Killer cells. In (Paul WE): Fundamental Immunology. 2nd edition. Raven Press.: 735-752.

- Bornef J. 1960. Carcinogenous in Water and Soil IV, Feeding Experiments with 3-4 Benzopyrene and Detergents. Arch. Hyg. Bacterial. 144:249.
- Bradley LM, Dalton DK & Crofi, M, 1996. A Direct Role for IFN γ In Regulation of Th1 cell Development, In The Journal of Immunology the American Association Press, 157; 1350-1358.
- Brook KH, Fernandez-Botran R. 1994. Tissue and Cell Culture. In (Delves): Cellular Immunology. BIOS Scientific Publisher. Blackwell Scientific Publication : 57-60.
- Cabridenc R. 1982. Attitude Toward Nonionik Detergents as a Factor in Water Polution. Ralative to Anionic Detergents. Water Research 3:289-291.
- Cain RB, Willet AJ., and Bird. JA. 1971. Surfactans Biodegradatins; Metabolism and Enzymology. In International Biodeteration Simposium. Lunter.
- Chanlet ET. 1973. Environmental Protection. Mc Graw Hill, Kogakusha Ltd. Tokyo. : 139-195.
- Cheng GJ, Morrow-Tesch JL, Beller DI, Levy EM, and Black PH. 1990. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. Brain Behav Immun; 4(4) : 278-91.
- Chrousos GP and Gold PW, 1992. The Concepts of Stress And Stress System Disorders. Overview of Physical And Behavioral Homeostasis. Published Erratum Appears In JAMA. 8; 268 (2) : 200.
- Clark WR 1983. The Experimental Foundation of Modern Immunology. 2 nd ed. : 207-213. John Wiley & Sons.
- Cochrane Charles G, 1991. Cellular injury by Oxidants. The Am.J. Med. 91 (Suppl. 3c): 23-30.
- Cooley WW and Lohnes PR, 1986. Multivariate Data Analysis, Florida : Robert E Kriger Publishing Co., pp v-vi, 325.
- Culloch JM, Martin SJ, 1994 Assays of Cellular Activity. In (Delves PJ): Cellular Immunology Lab. Fax, Bios Scientific Publisher. Blackwell Scientific Publisher : 95-111
- Cuvelier CA. et al 1993. M. cells are damaged and increased in number in inflamed human ileal mucosa. Evr J Morphol 1993. Mar-Jun; 31 (1-2) : 87-91.

- Darnel J, Lodish H, Baltimore D. 1990. *Molecular Cell Biology*. Second Edition. Scientific Americans Books, Inc. U.S.A.
- Davidson L, 1980. *Tropical Immunology; Research for Development seminar three*, Commonwealth Institute of Health in the University of Sydney.
- Dean JH, Cornacoff JB and Luster MI, 1990. *Toxicity to The Immune System : A Review*. New York: Plenum Press 1:377.
- Didik TS, 1992. *Skripsi. Sigi Konsentrasi Limbah Deterjen Dalam Air Baku Air Minum Kota Madya Surabaya*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Djeu JY, 1992. *Monocyte/Macrophage Function*. In (Rose NR, deMacario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM) : *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 4th edition. American society for Microbiology : 231-235.
- Durie FH, Foy TM, Maters SR, Lamar JD, Moelle RJ. 1994. *The role of CD 40 in the Regulation of humoral and cell-mediated immunity*. *Immunology to day*. Vol 19 no. 9 : 406-410.
- Eisen HN, 1982. *Immunology*. 2 nd ed. 399. Herper and Row Publisher. Philadelphia : 494-501
- Egger J, 1992. *From Psychobiological Stress Research To Neuropsycholoimmunology*. *Pediatr-Pada*, 27(4); 91-6.
- Ekowati G, Hariyati N, Arisoelaningsih E. 1992. *Respirasi Tanah Sawah dan Kebun yang terkena Deterjen dan Usaha Isolasi Mikroba Tanah Pengurai Deterjen*. *Laporan Penelitian DP4M*. Depdikbud. 53 hal.
- Fletcher MA, Klimas N, Morgan R, Gjerset G, 1992. *Lymphocyte proliferation*. In (Rose RR, de Macario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM): *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 4th edition. American society for microbiology. : 213-219.
- Fridovich Irwin, 1978 *The Biology of Oxigen Radicals*. *Science*, 201:875-880.
- Fujimura Y, 1986. *Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer patches- Phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit peyer patches*. *Gastroenterol Jpn*. 1986 Aug; 21 (4) : 325-35.
- Gallin JL, 1989. *Inflammation*. In (Paul WE): *Fundamental Immunology*. 2nd Edition. Raven Press. 721-734.

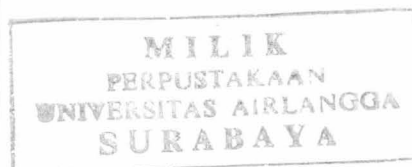
- Ganong WF, 1989. *Review of Medical Physiology*. Lange Medical Publications, Los Altos, California 94022. U.S.A.
- Gibson J, et al, 1985. A role for suppression T cells in induction of self tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 5150.
- Glen J, Lawlor J. 1981. *Manual Alergy and Immunology: Diagnosis and Therapy*. Little Brown and Company, Boston : 1-13.
- Goodman JW, 1991. The Immune Response. In *Basic Human Immunology*. First Edition, Prentice Hall International, Inc. 34-44.
- Goundasheva D, Andonova M, Ivanov V. 1994. Changes in some parameters of the immune response in rats after cold stress. *Zentralbl Veterinarmed (B)*; 41 (10) : 670-4.
- Grayson M Ed, 1983. *Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Third Edition Vol.22.A Wiley Intersciency Publication. John Wiley and Sons. New York p.1-2, 332-351.
- Guyton AC, 1989. *Text Book of Medical Physiology*. Fifth Edition. W.B. Saunders Company Philadelphia London Toronto.
- Halliwell B, 1991. Reactive oxygen species in Living system : Sources, biochemistry and role in human disease. *The American Journal Med.* 91 : (Suppl. 3c). pp 14 – 21.
- Henry JB, 1991. *Clinical Diagnosis Management by Laboratory Methods*. Philadelphia, WB Saunders Company : 234.
- Herbert WJ, Kristensen F, 1986. Laboratory Animal techniques for Immunology. In (Weir DM): *Applications of Immunological Methods in Biomedical Science*. Vol. 4. Blackwell Scientific Publication. 133.1 – 133.33.
- Hiroshi Kiyono, Jerry R. Mc Ghee. 1994. Mucosal Immunology : intra Epithelial Lymphocytes Advances in Host Defense Mechanism. Vol. 9. Raven Press, New York : 79-89.
- Holden RJ, Pakula IS, and Mooney PA. 1998. An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma. *Med Hypotheses* Oct; 51 (4): 309 – 14.
- Hudson L, Hay FC. 1976. *Practical Immunology*. Third Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne. p.477-454.

- Hume CW, 1972. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animal*. Forth Edition. Churchill Livingstone, Edinburg and London: 199-204.
- Hyde RM, Patnode RA, 1987. *Immunology : The National Medical Series for Independent Study*. A WileyMedical Publication, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore. Harwal Pubblishing Company Media, Pennsylvania : 61-83.
- Jarry A, Roba SZ, Kiewicz M, Brousse N, Potet F 1989. Immune cells associated with M cells in the follicle – associated epithelium of Peyer's patches in the rat. An electron – and immuno-electron-microscopic Study. *Cell Tissue Res* 1989 Feb; 255 (2) 293-8.
- Kato, T and Owen, RL, 1994. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: *Handbook of Mucosal Immunology*, P.L. Ogra et al. Academic Press, pp. 11-26.
- Keller SE et al, 1981. Suppression of immunity by stress : effect of a graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science* 1981 Sep 18; 213 (4514) : 1397-400.
- Keller SE, Weiss JM, Schleifer SJ, Miller NE, and Stein M. 1983. Stress-induced Suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science*; 221 (4617) : 1301-4.
- Kiecolt-Glaser JK and Glaser R, 1992. Psychoneuroimmunology; can psychological interventions modulated immunity. *J Consult-Clin.-Psychol.* 60(4): 569-575.
- Kincade PW, Gimble JM, 1989 Lymphocyte. In (Paul WE): *Fundamental Immunology*, 2nd edition. Raven Press.p.41-55.
- Kinght SC, 1987. Lymphocyte Proliferation Assay. In (Klaus CGB): *Lymphocyte, a practical approach*. IRL Press: 135-147.
- Kishimoto T, Hitano T, 1989. B Lymphocyte activation, Proliferation and Immunoglobulin Secretion. In (Paul WE,): *Fundamental Immunology*. 2nd edition. Raven Press.p.385-215.
- Klein J, 1990. *Immunology*. Blackwell Scientific Publication : 227 – 419.
- Kuby J, 1994. *Immunology*. W.H. Freeman and Company : 239-367.
- Kuhn EM, Kaup FJ (1996). Morphological Characteristics of the Neel Peyer's patches in the rhesus macaque ; a histological and ultra structural study. *Anat Histol Embryol* 1996 Mar; 25 (1) : 65-9.

- Law CL, Sidorenko SP, Clark EA. 1994. Regulation of lymphocyte activation by the cell-surface molekul CD22. *Immunology To day*. Vol 15 No. 9 : 442-448.
- Lewis L, 1991. Cells of the Immune Response. In (Stites DP, Terr AD): *Basic and Clinical Immunology*. 7th edition. A Lange Medical Book. Prentice-Hall International Inc.: 71.
- Loomis,TA 1978. *Essentials of Toxycology*. Lea and Febiger. Philadelphia.p. 13-28.
- Ma'at S, 1996. Desertasi. *Phyllanthus Niruril sebagai imunostimulator pada mencit*. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya : 182-1987
- Malz F, 1982. *Synthetic Detergents and Water, The Solution of Pobleem in Germany*. *Water Research*. 3 : 293 – 302.
- Mc Cance KL, Shelby J, 1994. *Stress and Disease*. In *Pathophysiology. The Biologic Basic for Disease in adult and Children*. Mosby – Year Book, Inc. St. Louis. Missouri. pp 299-317.
- Mills J, 1991. *Viral infection*, In (Stites DP, Terr AD): *Basic and Clinical Immunology, Seventh Edition*. A Lange Medical book. Prentice-Hall International Inc: 646-656.
- Mitruka, BM, H.M. Rawnstley, and D.V. Vadehra. 1976. *Animals for Midical Research, Models for the Study of Human Disease*. John Willey & Sons. New York.p.23-25.
- Moffett David F, et al, 1993. *Molecular structure of membran Human Phisiology second edition copyright , 1993 by Mosby – year book, Inc. P. 138-141*.
- Monjan AA and Collector MI.1976. *Stress-Induce Modulation Of The Immune Response 196: 307-308*.
- Morrison RT and Boyd, 1992. *Organic Chemistry*. Allyn & Bacon. Inc., Boston. : 131-142.
- Murphy ML, 1972.*Factors Influensing Teratogenic Respons to Drugs*. P. 145-184
- Norman ROC, 1968 : *Priciples of organic Synthesis*; Chapman and Hall; Second edition, New York, 534-565.
- Ogra Pearay Letal, 1994. *Mucosal Immunology* edited by Pearay Ogra. Akademik Press Inc. San Diego, California : 79-92
- Oppenheim JJ. et al, 1986. *Interleukin and interferon*. In *Basic and Clinical Immunology*. 6 th, ed. Daniel P. Stites et al. Appleton and Lange Norwarlk, PP. 82-95

- Panerai AE, Sacerclote P, Bianchi M and Manfredi B, 1997. Intermittent but not continuous inescapable foot shock stress and intracerebroventricular interleukin-1 Similarly affect immune responses and immunocyte beta-endorphin concentrations in the rat. *Int J Clin. Pharmacol Res*; 17 (2-3) : 115-6
- Parker SP Ed 1993. *McGraw Hill Encyclopdia of Chemistry. Second Ed.* Mac Graw Hill, Inc. New York San Fransisco Washington D.C.p.277 – 278, 367, 622-623, 638-639, 1065.
- Partoatmodjo S 1979. *Penelitian Kriteria Kualitas Lingkungan Hidup, Kota Surabaya.* IPB Bogor. Laporan tidak diterbitkan.
- Pinel JPJ, 1993. *Biopsychology. 2nd edition.* Boston : Allyn and Bacon, pp 589-593.
- Pine HS et al, 1981 “Organic Chemistry” International Student “Ed, Mc Graw. Hill Int. Book Company, New York, pp 863-891.
- Poernomo B, 1984. Makalah. Efek Toksik Detergen. Fak. Pasca Sarjana, IPB Bogor.
- Poernomo B, 1986. Tesis. Efek Teratogenik Alkyl Benzene Sulfonate Terhadap Embrio Dan Toksisitas Terhadap Mencit (*Mus Musculus*). Fak. Pasca Sarjana, IPB Bogor.
- Puji Rahardjo WJ, 1993. *Konsep Metode Penelitian dalam Metode Penelitian Dan Statistik Terapen.* Poerwadi T, Joesoef AA dan Widjaja L. Surabaya : Airlangga University Press, hal 1-7.
- Putra ST, 1984. *Perubahan Gambaran Sitologik Kelenjar Getah Bening dan Kadar Gama Globulin Serum Marmut Akibat Injeksi Vaksin Marek.* Tesis Universitas Airlangga Surabaya.
- Putra ST, 1990. *Pola Imunopatologik Kelenjar Getah Bening Regional sebagai Proknotikator Kanker Payudara. Suatu Pendekatan Morfofungsional.* Disertai Universitas Airlangga Surabaya, 18-127 Disertasi.
- Putra ST, 1997. *Konsep Patobiologi dan Imun Mukosal, Imunologi Mukosal Kedokteran, Graha Masyarakat Umiah FK. Unair Surabaya, 27-35.*
- Putra ST, 1998. *Konsep Psikoneuroimunologik Dan Kontribusinya Pada Pengembangan IPTEK Kedokteran. Diskusi Panel Kontribusi Psikoneuroimunologi di bidang Kedokteran di Indonesia.* Gramik FK. Unair.
- Putra ST, 1999. *Development of Psychoneuroimmunological Concept, Folia Medica Indonesiana : Nomor 1/199, Tahun XXXIV.*

- Ravindran AV, Griffiths J, Merali Z, Anisman H, 1998. Circulating lymphocyte subsets in major depression and dysthymia with typical or typical features. *Psychosom Med.* 60 (3) : 283-9
- Rayner D, 1994. Tissues and cells of the Immune system. In (Delves PJ) : *Cellular Immunology Labfax*. Blackwell Scientific Publisher Limited.p.17-31.
- Reith EJ, and MH Ross, 1977. *Atlas of Descriptive Histology* Harper dan Row Publishers. New York.p. 1976-1979.
- Ritz HL, Evans BLB, Bruce, Fletcher ER, Fisher GL. and Sarto K, 1993. Respiratory and Immunological Responses of Guines Pigs to Enzyme Containing Detergents: A Comparison of Intratrached and Inhalation Modes of Exposure. *Fudamental and Applied Toxicology* 21-37.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 1993. *Immunology, Third Edition*. Churchill Livingstone, Gower Medical Publishing : 8.1 – 8.15.
- Roitt I, 1994. *Essential Immunology, Eighth Edition*, Oxford Blackwell Scientific Publication : 5 – 20.
- Romagnani S, 1994. TH1 and TH2 subsets of CD4 + T Lymphocytes. *Scientific American, Science and Medicine*, May-June 1994 : 68-71.
- Ron Y, 1994. Ontogeny and Differentiation of T Lymphocytes : B-T cell function, In (Sigal LH, Ron Y). *Immunology and Inflammation : Basic Mechanisms and Clinical Consequences*. McGraw Hill Inc. : 142.
- Rybakina EG, Shanin SN, Kozinets 1A, Fomicheva EE, and Korneva EA, 1997. Cellular mechanis ms of cold stress elated immunosuppression and the action of interleukin 1. *Int J. Tissue React*; 19 (3-4) : 135-40.
- Schlegel HG, 1992. *General Microbiology. Sixth sEdition*.Cambridge University Press.p.426-433.
- Schleifer SJ and Keller SE, 1992. Stressful Events. Depressive Disorders, and Immunity. In (schmoll HJ, eds). *Psychoneuroimunology*. Lewiston : Hogrefe and Huber Publishers, pp 91-99.
- Sies Helmut, 1991. *Oxidative Stress : From Basic Research to Chemical Application*. The Am .J. Med. 91 (Suppl. 3c): 31-38.
- Sigal LH and Ron Y, 1994. *Immunology and Inflation* New York : McGraw-Hill. Inc., pp 465-494.



- Sigal LH, 1994. Immunologi and inflamation Basic Mechanisms and Clinical Consequaces, 470-471.
- Silverstain AM, 1989. The History of Immunology, In Fundamental Immunology, 2nd ed. William E. Paul (ed) Raven Press, New York.
- Stites DP, Stobo JD, Fundenber HH and Wells JV. 1982. Basic and Clinical Immunology. 5 edit., Maruzen Asian edit., 187-204, 316, 342-345.
- Stites DP, Terr AL, 1991. Basic and Clinical Immunology 61; Lange Medical Book. Prentice – Hall International/Inc.; 61
- Sugai S, Murata K, Kitagi T, I Tomita, 1990. Studis on eye irritation caused by chemicals in Rabbits. A. Quantitative structure activity relationship approach to primary eye irritation of chemicals in rabbits. J. Toxicol. Sci. 15 (4) : 245-262.
- Sugiharto, 1987. Dasar-dasar Pengolahan Limbah. UI Press. Jakarta.
- Sutamihardja RTM, 1983. Laporan penelitian Fosfat Sungai Ciliwung. IPB. Bogor. Laporan Penelitian Tidak Diterbitkan.
- Sykes Peter 1981, A Guide book to mechanism in organic chemistry Longman, London and New York Fifth edition Longman Group Ltd 1981 pp 291-314.
- Swisher RD, 1982. Anionik Surfactant and the Environment Progress in Water Technology. 3 : 303 - 306.
- Thurau K Beylan JW, and J.Mason. 1979. Pathophysiology of Acute Renal Failure.p.64-88.
- Tomasi TB, 1982. The Secretary Immune System In Basic & Clinical Immunology, Stites,D.P.; Stobo,J.D.; Fudenberg, H.H. & Welss. 1982. In 5 edit., Maruzen Asian Edition, Singapore, 187-197.
- Uchida J, 1988. Electron Microscopic study of microfold cells (M cells) in normal and inflamed human appendix. Gastroenterol Jpn 1988 Jun; 23 (3) : 251-62.
- Ueki T et al, (1995). Expression of ICAM I on M cells covering isolated lymphoid follicles of the human colon. Acta Med Okoyama 1995 Jun; (3) : 145-51
- Wagner H, Jurcic K, 1991. Assay for immunomodulation and effect on mediators of inflammation. In (Dey PM, Harborne JB.) Methods in Plant Biochemistry, Vol.6 : Assays for Bioactivity. Academic Press, London : 195-217.
- Walker WA, 1986. Antigen handling by the small intestine. In. JA Walker Smith Ed. Paediatric Gastroenterology. London WB Saunders co , 1.

- Weiss A, 1989. Lymphocyte activation. In (Paul WE): Fundamental Immunology. 2nd edition. Raven Press.p.359-364.
- Wignyanto,1998. Desertasi. Biodegradasi Alkil Benzen Sulfonat Pendekatan Eksperimental. Laboratorik untuk pengolahan limbah Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya : 142-143.
- Wilson JG, and Warkany J. 1973. Environment and Birth Defects. Academic Press Inc. New York. P. 137-195.
- Zainuddin M, 1988. Metodologi Penelitian. Surabaya : Inpress, pp 25-29, 56-76.

Lampiran 1.1

PERUSAHAAN DAERAH AIR MINUM
KOTAMADYA DATI II SURABAYA
INSTALASI PENJERNIHAN NGAGEL
TILP. : 577745

Malang, 07 Januari 1995

1. Contoh : I. Air baku, II. Air Distribusi
3. Jam : I. 09.00 wib, II. 09.15 wib

2. Tanggal : 07 Januari 1995
4. Lokasi : Instalasi Penjernihan air Iteim Kayoran.

No.	Pemeriksaan atas	(I) Hasil analisa Air Baku	Syarat-syarat air baku kelas B Max yang di- perbolehkan (sesuai PER- MENKES No.- 173/MENKES/ PER/VIII/77)	(II) Hasil Analisa Air Distribusi	Syarat-syarat air minum Maxi- mum yang diperbolehkan (Sesuai PER- MENKES RI No.:416/MENKE S/PER/IX/90)
I. UJI FISIKA					
1.	Kekeruhan (SKALA NTU)	70		0,25	1 - 5
II. UJI KIMIA					
1.	Reaksi PH	7,4	6,5 - 8,5	6,9	6,5 - 8,5
2.	Sulfat (ppm SO ₄)	34,29	400	113,83	250
3.	Nitrit (ppm NO ₂)	0,33	+ 10 ppm N	0,0	10 ppm N
4.	Oksigen terlarut (ppm O ₂)	1,06	4 - 6	6,77	Diatas 5
5.	Tembaga (ppm Cu)	2,27	1	0,004	1.0
6.	Ammonium (ppm NH ₃)	6,1	(0.05 ppm N)	0,7	0,0 ppm NH ₃
7.	Sulfida (ppm H ₂ S)	0,05	0.0	0,02	0,05
8.	C.O.D (ppm O ₂)	33,35		13,55	
9.	B.O.D	13,5	3 - 5	6,0	
10.	Detergent Anionik (ppm MBAS)	0,16		0,013	0,05
11.	Total Coll (CFU)	-	1 - 10 ⁴	0,0	0,0

Lampiran 1.2

PERUSAHAAN DAERAH AIR MINUM
KOTAMADYA DATI II SURABAYA
INSTALASI PENJERNIHAN NGAGEL
TILP. : 577745

Malang, 26 April 1995

1. Contoh : I. Air baku, II. Air Distribusi
3. Jam : I. 07.45 wib, II. 08.00 wib

2. Tanggal : 25 April 1995
4. Lokasi : Instalasi Penjernihan air Kayoon.

No.	Pemeriksaan atas	(I) Hasil analisa Air Baku	Syarat-syarat air baku klas B Max yang di- perbolehkan (sesuai PER- MENKES No.- 173/MENKES/ PER/VIII/77)	(II) Hasil Analisa Air Distribusi	Syarat-syarat air minum Maxi- mum yang diperbolehkan (Sesuai PER- MENKES RI No.:416/MENKE S/PER/IX/90)
	I. UJI FISIKA				
1.	Kekeruhan (SKALA NTU)	45		0,15	1 - 5
	II. UJI KIMIA				
1.	Reaksi PH	7,6	6,5 - 8,5	7,0	6,5 - 8,5
2.	Nitrit (ppm NO ₂)	0,085	+ 10 ppm N	0,003	1,0 ppm N
3.	Oksigen terlarut (ppm O ₂)	4,23	4 - 6	5,02	Diatas 5
4.	Ammonium (ppm NH ₃)	0,4	(0.05 ppm N)	0,0	0,0 ppm NH ₃
5.	Chlor bebas (ppm Cl ₂) aktif	-	0.0	1,0	1,5
6.	Detergent Anionik (ppm MBAS)	0,264		0,035	0,05

Lampiran 1.3

PERUSAHAAN DAERAH AIR MINUM
KOTAMADYA DATI II SURABAYA
INSTALASI PENJERNIHAN NGAGEL
TILP. : 577745

Malang, 16 Oktober 1995

1. Contoh : I. Air baku, II. Air Distribusi
2. Jam : I. 07.45 wib, II. 08.05 wib

2. Tanggal : 16 Oktober 1995
4. Lokasi : Instalasi Penjernihan air Kayoon.

No.	Pemeriksaan atas	(I) Hasil analisa Air Baku	Syarat-syarat air baku klas B Max yang di- perbolehkan (sesuai PER- MENKES No.- 173/MENKES/ PER/VIII/77)	(II) Hasil Analisa Air Distribusi	Syarat-syarat air minum Maxi- mum yang diperbolehkan (Sesuai PER- MENKES RI No.:416/MENKE S/PER/IX/90)
	I. UJI FISIKA				
1.	Kekeruhan (SKALA NTU)	7,8		0,26	1 - 5
	II. UJI KIMIA				
1.	Reaksi PH	7,7	6,5 - 8,5	7,6	6,5 - 8,5
2.	Alkalinitas (ppm CaCO ₃)	96,2		91,0	500
3.	Karbondioksida bebas (ppm CO ₂)	3,43		4,14	Tak disyaratkan
4.	Nitrit (ppm NO ₂)	0,11		0,009	1,0 ppm N
5.	Oksigen terlarut (ppm O ₂)	5,3	4 - 6	6,69	Diatas 5
6.	Tembaga (ppm CU)	0,71	1	6,89	1,0
7.	Ammonium (ppm NH ₃)	0,6	(0,05 ppm N)	0,0	0,0 ppm NH ₃
8.	Chlor bebas (ppm Cl ₂) aktif	-	0,0	1,2	1,5
9.	Detergent Anionik (ppm MBAS)	0,26		0,031	0,05

Lampiran 1.4

PEMERINTAH KOTAMADYA DAERAH TK. II SURABAYA
PERUSAHAAN DAERAH AIR MINUM

HASIL ANALISA KUALITAS AIR PRODUKSI SECARA MINGGUAN
 INSTALASI PENIERNIHAN KARANGPILANG I.

Tanggal Pengambilan Sampel : 14 Agustus 1996

Jam : 08.15 WIB

Bulan : Agustus 1996

NO.	Parameter	Satuan	SK. Gub.	Hasil Analisa	Keterangan
1.	TDS	ppm	1000	206	
2.	Warna	Skala TCU	15	6	
3.	DO	ppm O ₂	-	5,59	
4.	Amonia	ppm NH ₃ -N	-	0,03	
5.	Nitrit	ppm NH ₂ -N	1	0,032	
6.	Nitrat	ppm NH ₃ -N	10	2,65	
7.	Fosfat	ppm PO ₄	-	0,11	
8.	Silikat	ppm STO ₂	-	22,15	
9.	Kalsium	ppm Ca	-	116,1	
10.	Magnesium	ppm Mg	-	27,86	
11.	Natrium	ppm Na	200	-	
12.	Kalium	ppm K	-	-	
13.	Klorida	ppm Cl	250	35,91	
14.	Sulfat	ppm SO ₄	400	22,04	
15.	Fluorida	ppm F	1,5	0,29	
16.	Sianida	ppm CN	0,1	-	
17.	Arsen	ppm As	0,05	-	
18.	Besi	ppm Fe	0,3	0,071	
19.	Aluminium	ppm Al	0,2	-	
20.	Krom	ppm Cr	0,05	0,02	
21.	Kadmium	ppm Cd	0,005	-	
22.	Maugau	ppm Mn	0,1	0,01	
23.	Raksa	ppm Hg	0,001	-	
24.	Zeng	ppm Zn	5	0,04	
25.	Tembaga	ppm Cu	1	0,08	
26.	Timbal	ppm Pb	0,05	-	
27.	Detergent	ppm	0,05	0,02	

PERMENKES RI : Syarat-syarat kualitas air minum maximum yang diperbolehkan sesuai PERMENKES RI No. 416/MENKES/PER/IX/90.

Lampiran 1.5

HASIL ANALISA KUALITAS AIR PRODUKSI SECARA HARIAN
INSTALASI PENJERNIHAN NGAGEL IIMinggu : I (tanggal 2 s/d 6)
Bulan : Desember 1996

No.	Parameter	Satuan	PERMINKES RI	Tanggal					Ket.
				2	3	4	5	6	
1.	Suhu	* C	Suhu udara + 3°C	27,4	28,3	27,6	27,5	27,2	
2.	Kekeruhan	Skala NTU	5	0,69	0,71	0,99	0,86	0,48	
3.	DHL	Umhes/cm	-	420	439	422	377	392	
4.	PH		5.5 - 8.5	7,0	7,0	7,3	7,3	7,1	
5.	Alkalinifitas	ppm CaCO ₃	-	71,8	74,6	56,4	58,9	62,3	
6.	CO ₂ bebas	ppm CO ₂	-	14,4	14,9	5,13	5,35	9,42	
7.	Zat Organik	ppm KmnO ₄	10	5,58	6,51	4,96	5,89	5,27	
8.	Sulfida	ppm H ₂ S	0.05	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	
9.	Total coli	Org/100 ml	0	0	0	0	0	0	
10.	Fecal coli	Org/100 ml	0	0	0	0	0	0	
11.	Klorin bebas	ppm Cl ₂	-	1,0	0,8	1,5	1,5	1,25	
12.	Detergent	Ppm MBAS	0,05	0,03	0,04	0,03	0,02	0,03	

PERMENKES RI : Syarat-syarat kualitas air minum maksimum yang diperbolehkan sesuai PERMENKES RI No. 416/MENKES/PER/IX/90

Lampiran 2.1

----- O N E W A Y -----

Variable BERAT
By Variable GROUP

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	38.8420	12.9473	2.8021	.0537
Within Groups	36	166.3420	4.6206		
Total	39	205.1840			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	Minimum	Maximum	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	10	29.3400	1.7575	.5558	25.7000	31.6000	28.0827 To 30.5973
Grp 2	10	29.1400	2.5661	.8115	25.2000	32.2000	27.3043 To 30.9757
Grp 3	10	26.8900	1.4992	.4741	25.4000	30.2000	25.8175 To 27.9625
Grp 4	10	28.9500	2.5614	.8100	25.4000	32.2000	27.1177 To 30.7823
Total	40	28.5800	2.2937	.3627	25.2000	32.2000	27.8464 To 29.3136
Fixed Effects Model			2.1496	.3399			27.8907 To 29.2693
Random Effects Model				.5689			26.7694 To 30.3906

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance .8327

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variiances) = .3563, P = .593 (Approx.)
 Bartlett-Box F = 1.200, P = .308
 Maximum Variance / Minimum Variance 2.930

Multiple Range Test

Tukey-HSD Procedure

Ranges for the .050 level -

3.81 3.81 3.81

The ranges above are table ranges.

The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$$1.5200 * \text{Range} * \sqrt{(1/N(I) + 1/N(J))}$$

No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 3	Grp 4	Grp 2	Grp 1
Mean	26.8900	28.9500	29.1400	29.3400

Lampiran 2.2

----- D E W A Y -----

Variable UMLR
By Variable GROUP

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	14.4000	4.8000	.3179	.8124
Within Groups	36	543.6000	15.1000		
Total	39	558.0000			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	Minimum	Maximum	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	10	50.3000	3.8887	1.2297	45.0000	55.0000	47.5182 To 53.0818
Grp 2	10	51.5000	3.7786	1.1949	45.0000	58.0000	48.7970 To 54.2030
Grp 3	10	49.9000	3.0350	.9597	45.0000	55.0000	47.7289 To 52.0711
Grp 4	10	50.3000	4.6679	1.4761	45.0000	58.0000	46.7608 To 53.6392
Total	40	50.5000	3.7826	.5981	45.0000	58.0000	49.2903 To 51.7097
Fixed Effects Model			3.8859	.6144			49.2539 To 51.7461
Random Effects Model				.6144			48.5447 To 52.4553

WARNING - Between component variance is negative
it was replaced by 0.0 in computing above random effects measures

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance -1.0300

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variiances) = .3607, P = .558 (Approx.)

Bartlett-Box F = .522, P = .667

Maximum Variance / Minimum Variance 2.366

Multiple Range Test

Tukey-HSD Procedure

Ranges for the .050 level -

3.81 3.81 3.81

The ranges above are table ranges.

The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..

$2.7477 \pm \text{Range} \pm \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

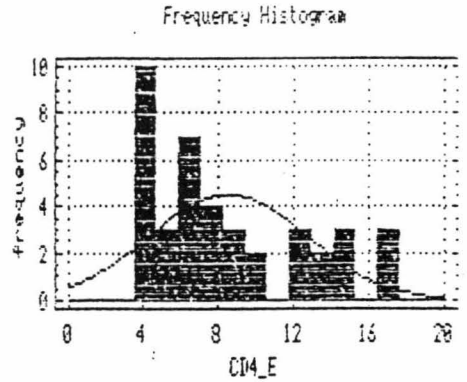
No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

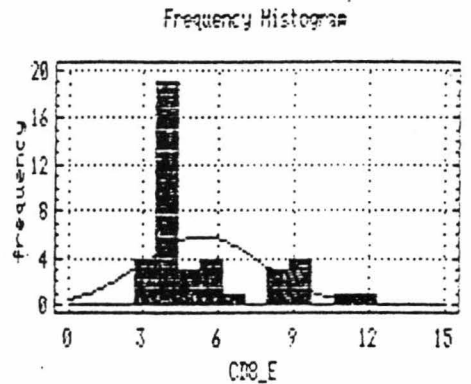
SUBGET 1

Lampiran 3.1

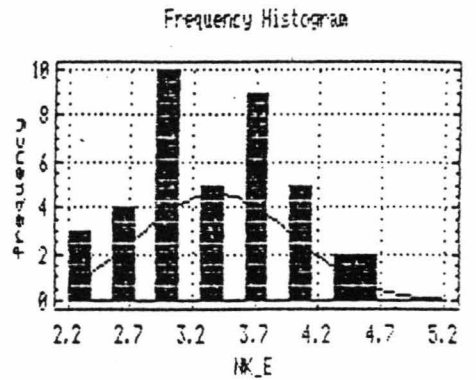
Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.149609
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.121145
 Estimated overall statistic DN = 0.149609
 Approximate significance level = 0.332163



Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.268008
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.137712
 Estimated overall statistic DN = 0.268008
 Approximate significance level = 6.38928E-3

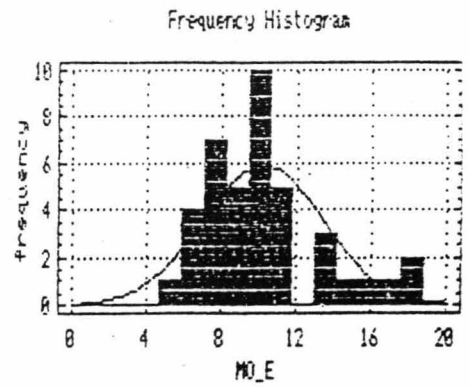


Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.159793
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.1301
 Estimated overall statistic DN = 0.159793
 Approximate significance level = 0.258789



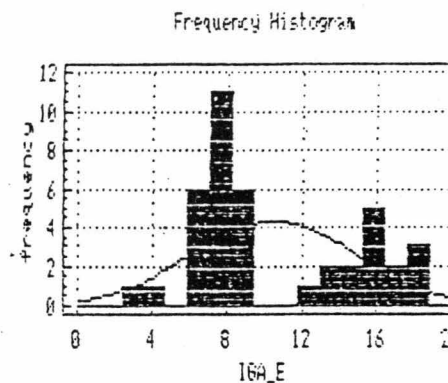
Lampiran 3.2

Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.160774
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.0682302
 Estimated overall statistic DN = 0.160774
 Approximate significance level = 0.252397

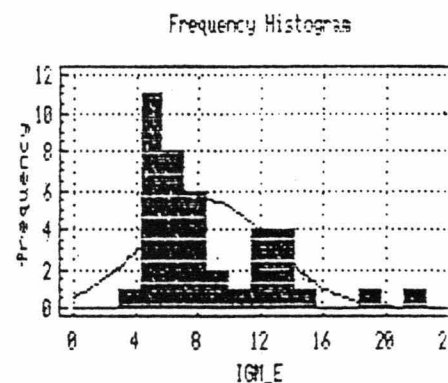


Lampiran 3.3

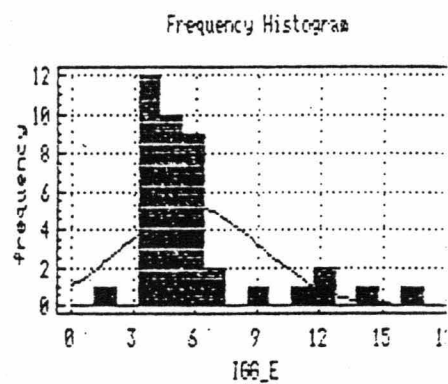
Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.229596
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.123487
 Estimated overall statistic DN = 0.229596
 Approximate significance level = 0.0294808



Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.174047
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.132122
 Estimated overall statistic DN = 0.174047
 Approximate significance level = 0.17712

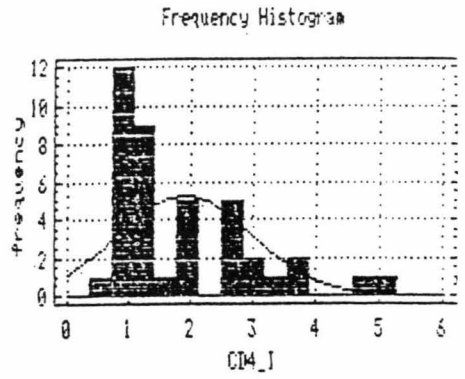


Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.254987
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.201813
 Estimated overall statistic DN = 0.254987
 Approximate significance level = 0.011017

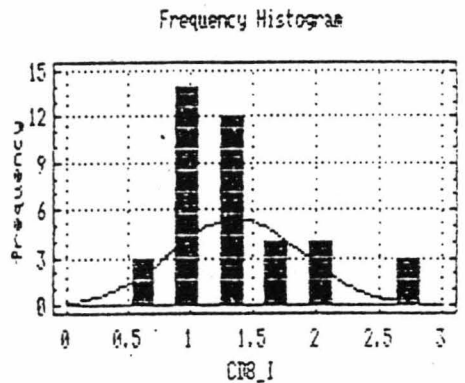


lampiran 3.4

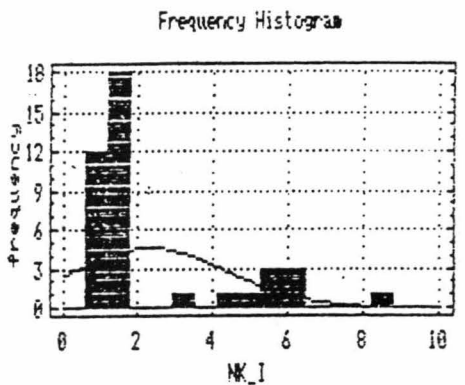
Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.251683
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.176676
 Estimated overall statistic DN = 0.251683
 Approximate significance level = 0.0125957



Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.253146
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.164178
 Estimated overall statistic DN = 0.253146
 Approximate significance level = 0.0118729

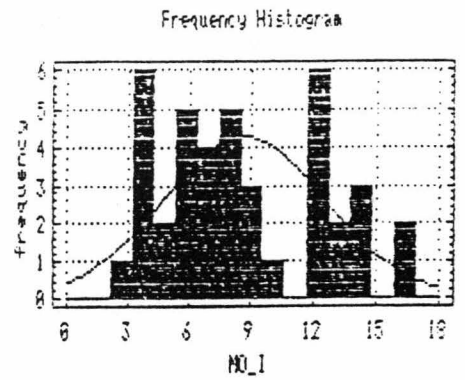


Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.375787
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.210572
 Estimated overall statistic DN = 0.375787
 Approximate significance level = 2.48139E-5



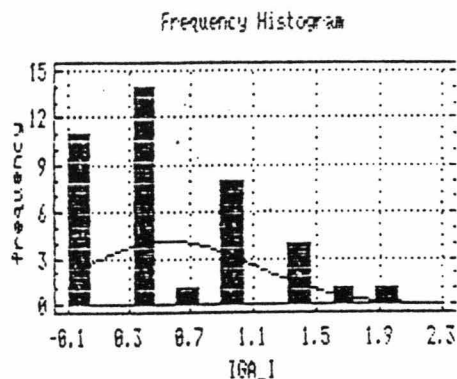
Lampiran 3.5

Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.117956
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.106359
 Estimated overall statistic DN = 0.117956
 Approximate significance level = 0.63387

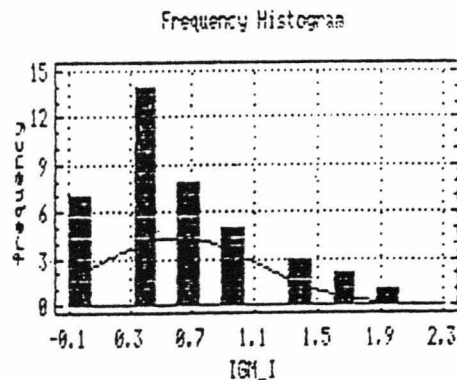


Lampiran 3.6

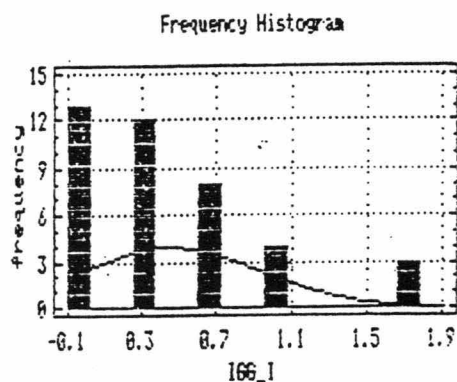
Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.28752
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.151747
 Estimated overall statistic DN = 0.28752
 Approximate significance level = 2.68446E-3



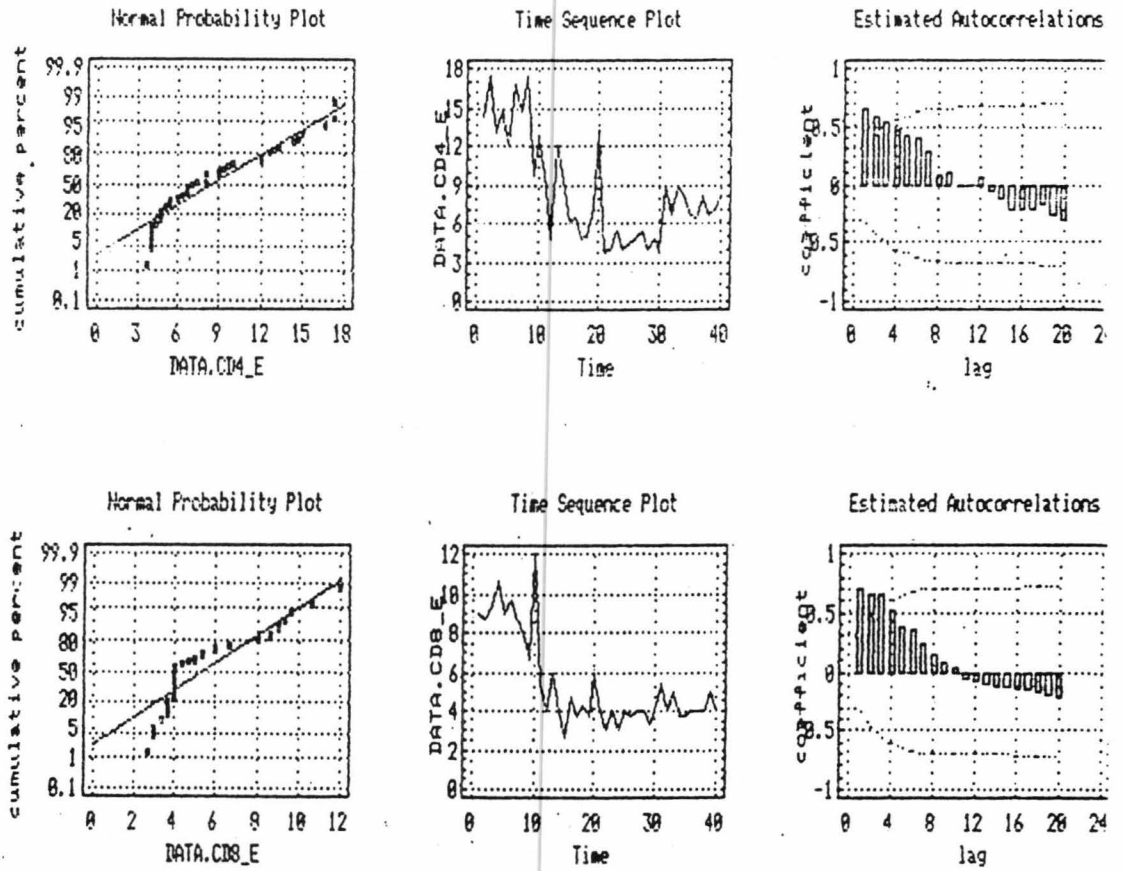
Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.231237
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.118763
 Estimated overall statistic DN = 0.231237
 Approximate significance level = 0.0277506



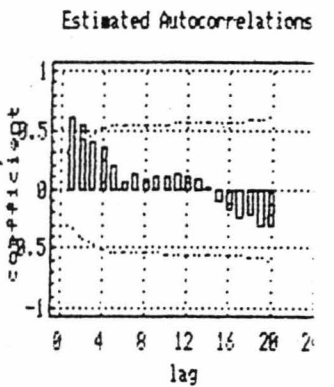
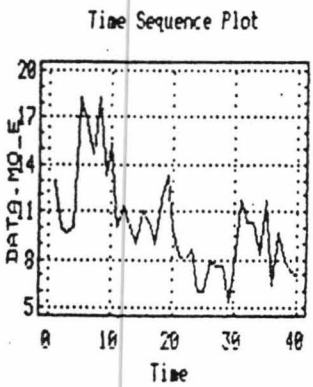
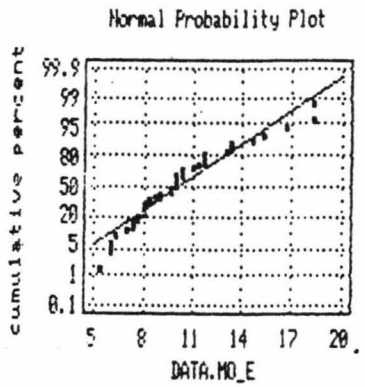
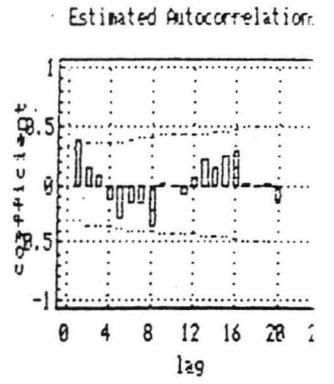
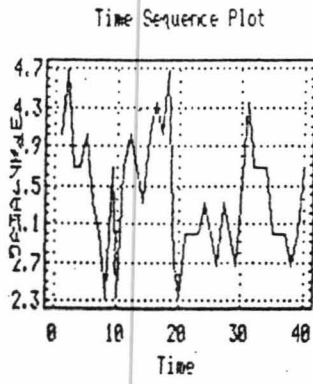
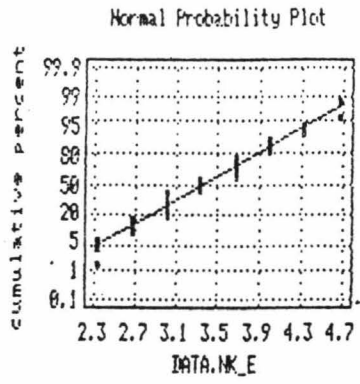
Estimated KOLMOGOROV statistic DPLUS = 0.231037
 Estimated KOLMOGOROV statistic DMINUS = 0.168235
 Estimated overall statistic DN = 0.231037
 Approximate significance level = 0.0279566



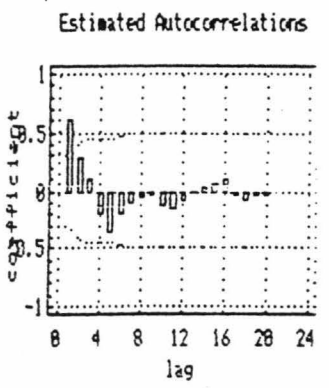
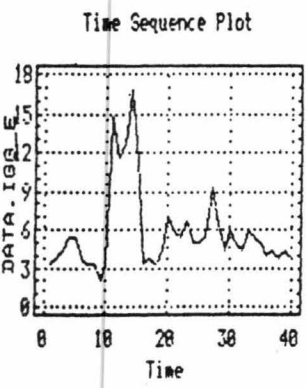
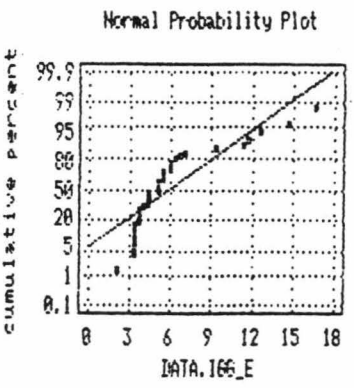
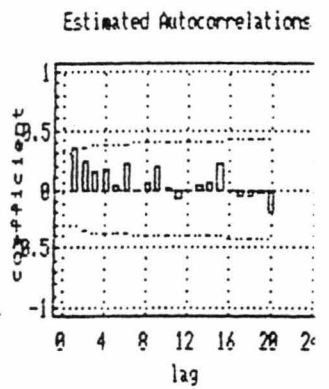
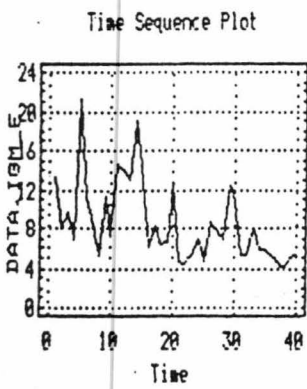
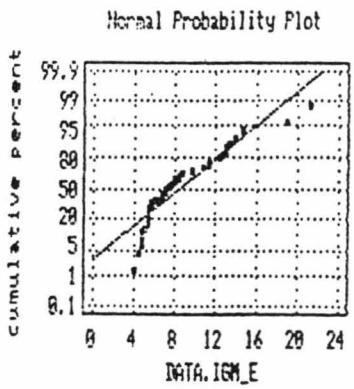
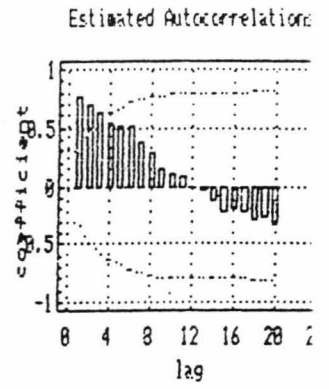
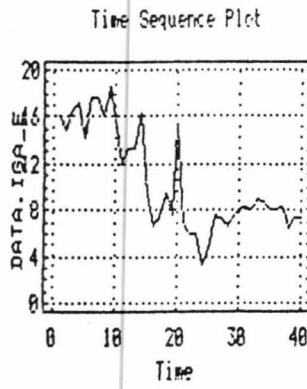
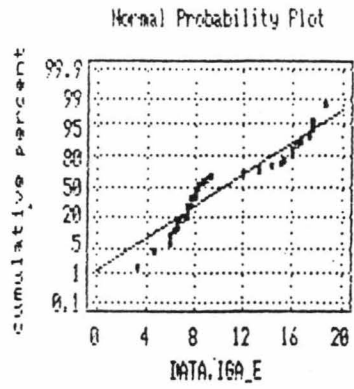
Lampiran 3.7



Lampiran 3.8

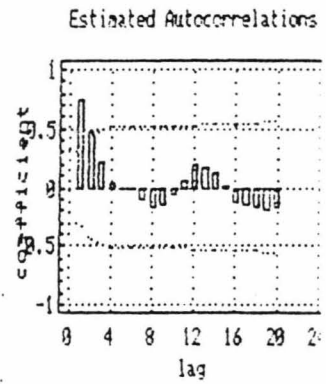
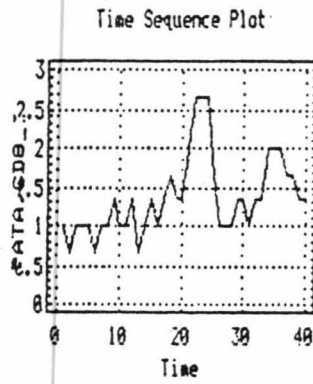
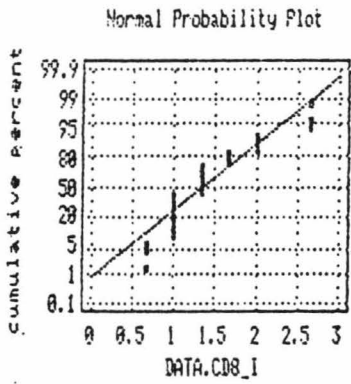
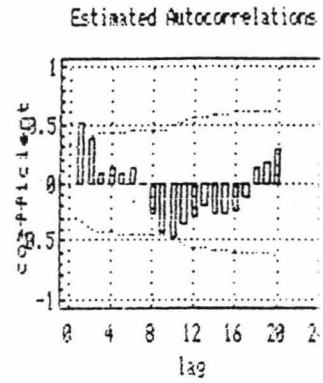
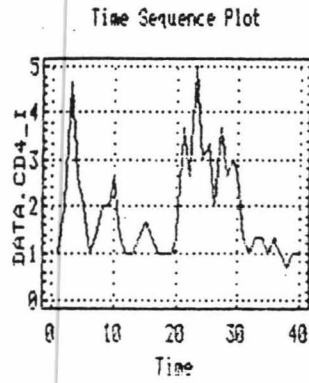
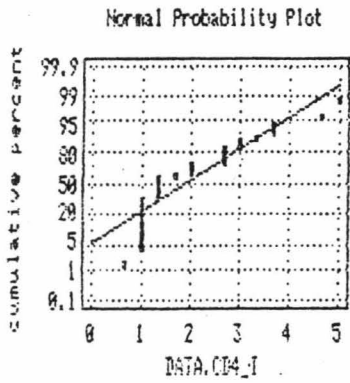


lampiran 3.9

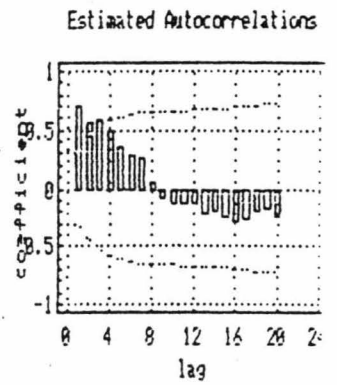
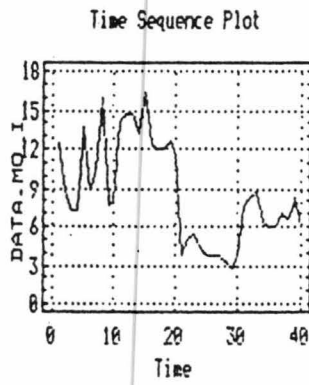
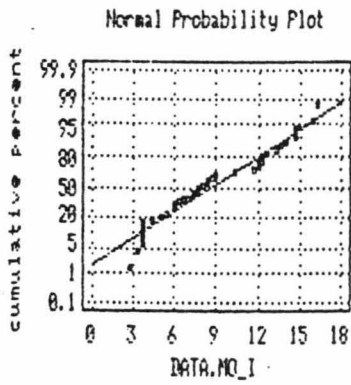
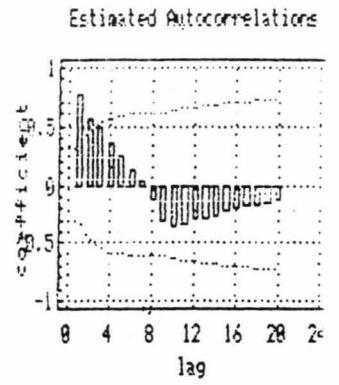
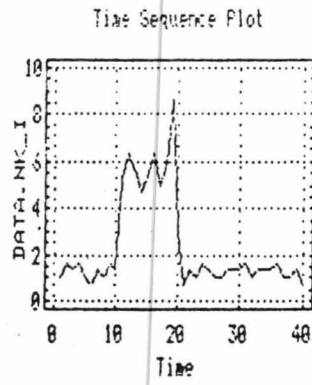
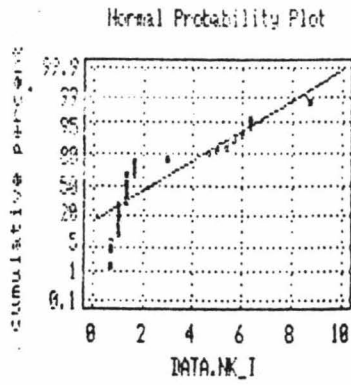


Lampiran 3.10
 Analisis 3.10

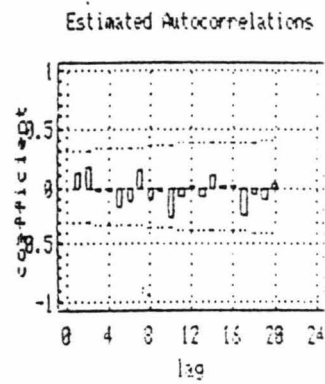
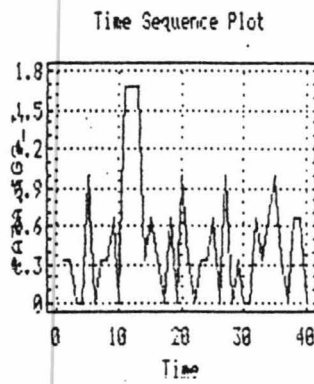
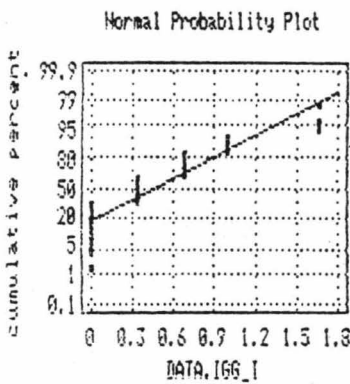
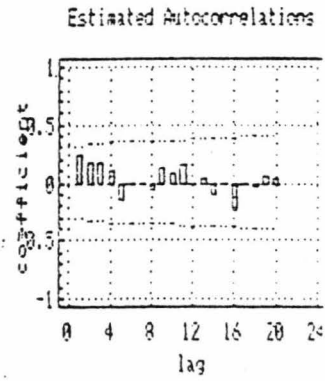
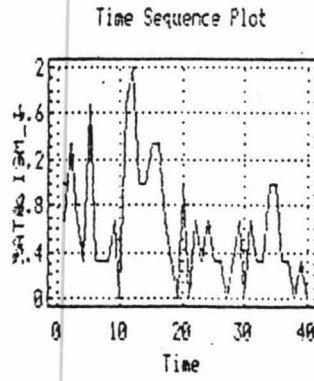
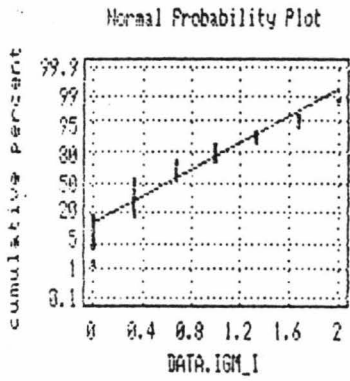
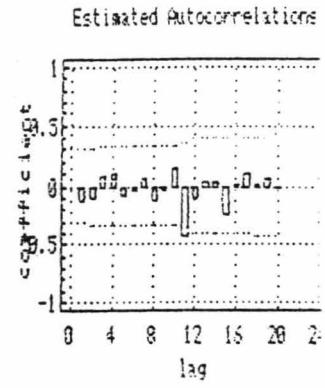
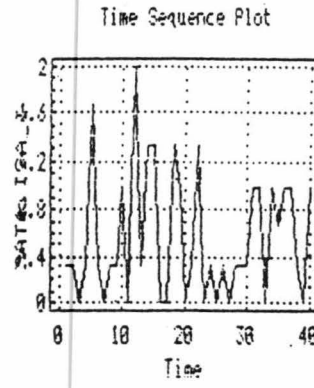
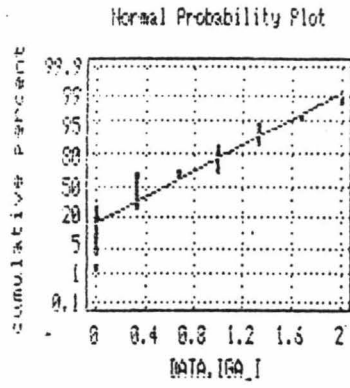
Analisis
 Analisis
 Analisis



ampiran 3.11



mpiran 3.12



Lampiran 4.1

UJI HOMOGENITAS DATA (antar pengamat I & pengamat II)

MAN IGA_I IGA_E IGM_I IGM_E IGG_I IGG_E CD4_I CD4_E CD8_I CD8_E NK_I NK_E MO_I MO_E
 BY anat(1,2)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/desig.

120 cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.
 0 cases rejected because of missing data.
 2 non-empty cells.

1 design will be processed.

CELL NUMBER

Variable	1	2
AMAT	1	2

Cell Means and Standard Deviations

Variable .. IGA_I

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval
AMAT	pengamat 1	.560	.533	60	.422 .698
AMAT	pengamat 2	.594	.484	60	.469 .717
For entire sample		.577	.507	120	.485 .669

Variable .. IGA_E

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval
AMAT	pengamat 1	10.089	4.017	60	9.051 11.126
AMAT	pengamat 2	10.250	4.151	60	9.178 11.322
For entire sample		10.169	4.068	120	9.434 10.905

Variable .. IGM_I

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval
AMAT	pengamat 1	.516	.474	60	.393 .638
AMAT	pengamat 2	.611	.593	60	.458 .764
For entire sample		.564	.537	120	.466 .661

Variable .. IGM_E

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval
AMAT	pengamat 1	7.118	4.211	60	6.030 8.206
AMAT	pengamat 2	7.405	4.677	60	6.197 8.614
For entire sample		7.262	4.434	120	6.460 8.063

Lampiran 4.2

Variable .. IGG_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
8E1	AMAT	pengamat 1	.406	.431	60	.294	.517
	AMAT	pengamat 2	.500	.493	60	.372	.627
	For entire sample		.453	.464	120	.369	.537

Variable .. IGG_E	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	AMAT	pengamat 1	5.639	3.230	60	4.804	6.473
	AMAT	pengamat 2	5.777	3.510	60	4.871	6.684
	For entire sample		5.708	3.360	120	5.101	6.315

Variable .. CD4_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	AMAT	pengamat 1	1.589	1.000	60	1.330	1.847
	AMAT	pengamat 2	1.739	1.216	60	1.425	2.053
	For entire sample		1.664	1.111	120	1.463	1.865

Variable .. CD4_E	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	AMAT	pengamat 1	7.522	4.011	60	6.486	8.558
	AMAT	pengamat 2	7.800	4.609	60	6.610	8.991
	For entire sample		7.661	4.305	120	6.983	8.439

Variable .. CD8_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	AMAT	pengamat 1	1.200	.525	60	1.064	1.336
	AMAT	pengamat 2	1.217	.591	60	1.064	1.369
	For entire sample		1.208	.557	120	1.108	1.309

Variable .. CD8_E	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	AMAT	pengamat 1	5.473	2.200	60	4.905	6.041
	AMAT	pengamat 2	5.528	2.282	60	4.939	6.117
	For entire sample		5.500	2.232	120	5.097	5.904

Variable .. NK_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	AMAT	pengamat 1	1.883	1.814	60	1.414	2.352
	AMAT	pengamat 2	1.934	1.878	60	1.448	2.419
	For entire sample		1.908	1.839	120	1.576	2.241

Lampiran 4.3

Variable .. MK_E		Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
FACTOR	CODE					
AMAT	pengamat 1	3.506	1.316	60	3.166	3.846
AMAT	pengamat 2	3.383	1.313	60	3.044	3.723
For entire sample		3.445	1.310	120	3.208	3.682

Variable .. MO_I		Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
FACTOR	CODE					
AMAT	pengamat 1	7.428	3.735	60	6.463	8.393
AMAT	pengamat 2	7.805	4.041	60	6.762	8.849
For entire sample		7.617	3.890	120	6.915	8.318

Variable .. MO_E		Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
FACTOR	CODE					
AMAT	pengamat 1	9.544	3.028	60	8.762	10.326
AMAT	pengamat 2	9.600	3.244	60	8.762	10.438
For entire sample		9.572	3.125	120	9.007	10.137

Lampiran 4.4

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN I *****

EFFECT .. AMAT

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 6, N = 51 1/2)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.03469	.26950	14.00	105.00	.996
Hotellings	.03593	.26950	14.00	105.00	.996
Wilks	.96531	.26950	14.00	105.00	.996
Roys	.03469				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	.03593	100.00000	100.00000	.18624

Univariate F-tests with (1,118) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGA_I	.03536	30.59747	.03536	.25930	.13638	.713
IGA_E	.78085	1968.90570	.78085	16.68564	.04680	.829
IGM_I	.27265	33.99768	.27265	.28812	.94633	.333
IGM_E	2.47394	2336.89819	2.47394	19.80422	.12492	.724
IGG_I	.26508	25.33567	.26508	.21471	1.23460	.269
IGG_E	.57685	1342.55227	.57685	11.37756	.05070	.822
CD4_I	.67500	146.32924	.67500	1.24008	.54432	.462
CD4_E	2.32130	2202.86041	2.32130	18.66831	.12434	.725
CDB_I	.00817	36.91737	.00817	.31286	.02611	.872
CDB_E	.09130	592.67278	.09130	5.02265	.01818	.893
NK_I	.07651	402.21202	.07651	3.40858	.02245	.881
NK_E	.44896	203.87103	.44896	1.72772	.25986	.611
MD_I	4.28274	1786.77036	4.28274	15.14212	.28284	.596
MD_E	.09352	1161.71586	.09352	9.84505	.00950	.923

Averaged F-test with (14,1652) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 14	12.40225	12271.63604	.88587	7.42835	.11926	1.000

Lampiran 4.5

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN I*****

EFFECT .. CONSTANT

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 6, N = 51 1/2)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.96952	238.54340	14.00	105.00	.000
Hotellings	31.80579	238.54340	14.00	105.00	.000
Wilks	.03048	238.54340	14.00	105.00	.000
Rays	.96952				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	31.80579	100.00000	100.00000	.98464

Univariate F-tests with (1,118) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGA_I	39.97456	30.59747	39.97456	.25930	154.16301	.000
IGA_E	12409.8408	1968.90570	12409.8408	16.68564	743.74371	.000
IGM_I	38.10387	33.99768	38.10387	.28812	132.25188	.000
IGM_E	6327.96155	2336.89819	6327.96155	19.80422	319.52589	.000
IGG_I	24.58885	25.33567	24.58885	.21471	114.52175	.000
IGG_E	3909.75167	1342.55227	3909.75167	11.37756	343.63705	.000
CD4_I	332.20097	146.32924	332.20097	1.24008	267.88710	.000
CD4_E	7043.37020	2202.86041	7043.37020	18.66831	377.29022	.000
CDB_I	175.18417	36.91737	175.18417	.31286	559.94603	.000
CDB_E	3630.55003	592.67278	3630.55003	5.02265	722.83546	.000
NK_I	436.97017	402.21202	436.97017	3.40858	128.19726	.000
NK_E	1423.88741	203.87103	1423.88741	1.72772	824.14220	.000
MO_I	6961.48100	1786.77036	6961.48100	15.14212	459.74277	.000
MO_E	10994.9735	1161.71586	10994.9735	9.84505	1116.80224	.000

Averaged F-test with (14,1652) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 14	53748.83882	12271.63604	3839.20277	7.42835	516.83109	.000

Lampiran 5.1

MAN IGA_I IGG_I IGM_I CD4_I CDB_I NK_I MD_I BY group(1,2)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/deg.

20 cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.
 0 cases rejected because of missing data.
 2 non-empty cells.

1 design will be processed.

CELL NUMBER							
		1	2				
Variable							
GROUP		1	2				

Cell Means and Standard Deviations

Variable .. IGA_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	GROUP	ABS-K	-.134	.672	10	-.614	.346
	GROUP	LAS-K	.268	.814	10	-.315	.851
	For entire sample		.067	.755	20	-.286	.420

Variable .. IGG_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	GROUP	ABS-K	.000	.351	10	-.251	.251
	GROUP	LAS-K	-.166	.393	10	-.447	.115
	For entire sample		-.083	.373	20	-.257	.091

Variable .. IGM_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	GROUP	ABS-K	-.300	.485	10	-.647	.047
	GROUP	LAS-K	-.367	.595	10	-.773	.059
	For entire sample		-.334	.530	20	-.581	-.086

Variable .. CD4_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	GROUP	ABS-K	1.034	.869	10	.412	1.656
	GROUP	LAS-K	-1.367	1.083	10	-2.142	-.592
	For entire sample		-.166	1.559	20	-.876	.563

Variable .. CDB_I	FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
	GROUP	ABS-K	.767	.772	10	.215	1.319
	GROUP	LAS-K	-.232	.225	10	-.393	-.071
	For entire sample		.267	.754	20	-.085	.620

Lampiran-5.2- - -

Variable .. NK_1		Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
FACTOR	CODE					
GROUP	ABS-K	-.068	.305	10	-.286	.150
GROUP	LAS-K	-.567	.525	10	-.942	-.192
For entire sample		-.318	.490	20	-.547	-.088

Variable .. MO_1		Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
FACTOR	CODE					
GROUP	ABS-K	-6.132	3.375	10	-8.544	-3.718
GROUP	LAS-K	-6.267	3.478	10	-8.755	-3.779
For entire sample		-6.199	3.336	20	-7.761	-4.638

Lampiran 5.3

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN *****

EFFECT .. GROUP

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 2 1/2, N = 5)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.78338	6.19955	7.00	12.00	.003
Hotellings	3.61640	6.19955	7.00	12.00	.003
Wilks	.21662	6.19955	7.00	12.00	.003
Roys	.78338				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	3.61640	100.00000	100.00000	.88507

Univariate F-tests with (1,18) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGA_I	.80802	10.02680	.80802	.55704	1.45055	.244
IGG_I	.13778	2.50024	.13778	.13890	.99192	.332
IGM_I	.02244	5.31121	.02244	.29507	.07607	.786
CD4_I	28.82401	17.34845	28.82401	.96380	29.90654	.000
CDB_I	4.99001	5.81677	4.99001	.32315	15.44158	.001
NK_I	1.24501	3.31697	1.24501	.18428	6.75617	.018
MD_I	.09113	211.37077	.09113	11.74283	.00776	.931

Averaged F-test with (7,126) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 7	36.11839	255.69141	5.15977	2.02930	2.54264	.018

Lampiran 5.4

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN 1 *****

EFFECT .. CONSTANT

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 2 1/2, N = 5)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.91890	19.42245	7.00	12.00	.000
Hotellings	11.32976	19.42245	7.00	12.00	.000
Wilks	.08110	19.42245	7.00	12.00	.000
Roys	.91890				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	11.32976	100.00000	100.00000	.95859

Univariate F-tests with (1,18) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGA_I	.08978	10.02680	.08978	.55704	.16117	.693
IGG_I	.13778	2.50024	.13778	.13890	.99192	.332
IGH_I	2.22445	5.31121	2.22445	.29507	7.53877	.013
CD4_I	.55444	17.34845	.55444	.96380	.57527	.458
CD8_I	1.43112	5.81677	1.43112	.32315	4.42862	.050
NK_I	2.01613	3.31697	2.01613	.18428	10.94078	.004
MD_I	768.67600	211.37097	768.67600	11.74283	65.45917	.000

Averaged F-test with (7,126) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 7	775.12970	255.69141	110.73281	2.02930	54.56798	.000

Lampiran 6.1

MAN IGA_E IGM_E IGG_E CD4_E CD8_E NK_E MO_E BY group(1,2)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/desig.

20 cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.
 0 cases rejected because of missing data.
 2 non-empty cells.
 1 design will be processed.

Variable	CELL NUMBER					
	1	2				
GROUP	1	2				

Cell Means and Standard Deviations
 Variable .. IGA_E

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	-10.100	1.634	10	-11.269	-8.931
GROUP	LAS-K	-10.000	1.476	10	-11.056	-8.944
For entire sample		-10.050	1.516	20	-10.760	-9.340

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	-3.041	5.915	10	-7.272	1.190
GROUP	LAS-K	-3.575	4.624	10	-11.883	-5.267
For entire sample		-5.308	5.896	20	-8.567	-3.049

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	2.167	1.793	10	.884	3.450
GROUP	LAS-K	-1.063	1.041	10	-1.808	-.318
For entire sample		.552	2.187	20	-.471	1.575

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	-9.867	2.698	10	-11.797	-7.937
GROUP	LAS-K	-11.402	2.733	10	-13.357	-9.447
For entire sample		-10.635	2.758	20	-11.925	-9.344

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	-5.468	1.467	10	-6.517	-4.419
GROUP	LAS-K	-5.034	1.536	10	-6.133	-3.935
For entire sample		-5.251	1.479	20	-5.943	-4.559

Lampiran-6.2. ---

Variable .. NK_E		Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
FACTOR	CODE					
GROUP	ABS-K	-.434	.847	10	-1.040	.172
GROUP	LAS-K	-1.667	.970	10	-2.361	-.973
For entire sample		-1.051	1.089	20	-1.560	-.541

Variable .. MB_E		Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
FACTOR	CODE					
GROUP	ABS-K	-6.633	3.662	10	-9.252	-4.014
GROUP	LAS-K	-7.533	3.586	10	-10.099	-4.967
For entire sample		-7.083	3.558	20	-8.748	-5.418

lampiran 6.3

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN *****

EFFECT .. GROUP

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 2 1/2, N = 5)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.65816	3.30063	7.00	12.00	.034
Hotellings	1.92537	3.30063	7.00	12.00	.034
Wilks	.34184	3.30063	7.00	12.00	.034
Roys	.65816				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	1.92537	100.00000	100.00000	.81127

Univariate F-tests with (1,12) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGA_E	.05000	43.63350	.05000	2.42409	.02063	.887
IGM_E	153.12578	507.34253	153.12578	28.18570	5.43275	.032
IES_E	52.16450	38.68182	52.16450	2.14879	24.27396	.000
CO4_E	11.78113	132.73357	11.78113	7.37411	1.59763	.222
CO8_E	.94178	40.60060	.94178	2.25559	.41753	.526
NK_E	7.60145	14.93225	7.60145	.82957	9.16312	.007
MO_E	4.05000	236.43462	4.05000	13.13526	.30833	.586

Averaged F-test with (7,126) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 7	227.71465	1014.35937	32.81638	8.05047	4.07633	.000

Lampiran 6.4

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN 1 *****

EFFECT .. CONSTANT

Multivariate Tests of Significance (G = 1, M = 2 1/2, N = 5)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.79470	321.71059	7.00	12.00	.000
Hotelling	187.66451	321.71059	7.00	12.00	.000
Wilks	.00520	321.71059	7.00	12.00	.000
Roys	.99470				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	187.66451	100.00000	100.00000	.79735

Univariate F-tests with (1,12) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGA_E	2020.05000	43.63360	2020.05000	2.42409	833.32337	.000
IGN_E	674.65728	307.34233	674.65728	28.18570	23.93616	.000
IGB_E	6.09408	38.68182	6.09408	2.14677	2.83579	.107
CGA_E	2261.85182	132.73397	2261.85182	7.37411	306.72882	.000
COB_E	551.46002	40.60060	551.46002	2.25559	244.48604	.000
AK_E	22.07101	14.93225	22.07101	.82757	26.60337	.000
MO_E	1003.37778	236.43462	1003.37778	13.13526	76.38814	.000

Averaged F-test with (7,126) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 7	6539.56198	1014.35939	934.22314	8.05047	116.04577	.000

Lampiran 7.1

dsc group group(1,2)/VAR IGA_I IGM_I IGG_I CD4_I CD8_I NK_I MD_I /met rao/PIN=0.5/POUT=0.5/ana all/stat all.

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

20 (unweighted) cases were processed.
 0 of these were excluded from the analysis.
 20 (unweighted) cases will be used in the analysis.

Number of Cases by Group

GROUP	Number of Cases		Label
	Unweighted	Weighted	
1	10	10.0	ABS-K
2	10	10.0	LAS-K
Total:	20	20.0	

Group Means

GROUP	IGA_I	IGM_I	IGG_I	CD4_I	CD8_I	NK_I	MD_I
1	-.13400	-.30000	.00000	1.03400	.76700	-.06800	-6.13200
2	.26800	-.36700	-.16600	-1.36700	-.23200	-.56700	-6.26700
Total	.06700	-.33350	-.08300	-.16650	.26750	-.31750	-6.19950

Group Standard Deviations

GROUP	IGA_I	IGM_I	IGG_I	CD4_I	CD8_I	NK_I	MD_I
1	.67150	.48536	.35103	.86906	.77184	.30521	3.37462
2	.81435	.59545	.39317	1.08274	.22489	.52479	3.47816
Total	.75515	.52983	.37262	1.55989	.75417	.49000	3.33610

Wilks' Lambda (U-statistic) and univariate F-ratio
 with 1 and 18 degrees of freedom

Variable	Wilks' Lambda	F	Significance
IGA_I	.92542	1.451	.2440
IGM_I	.99579	.7607E-01	.7858
IGG_I	.94777	.9919	.3325
CD4_I	.57573	29.91	.0000
CD8_I	.53825	13.44	.0010
NK_I	.72709	6.756	.0181
MD_I	.99957	.7760E-02	.9308

Lampiran 7.2

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number 1

Stepwise variable selection

Selection rule: Maximize Rao's V
 Maximum number of steps..... 14
 Minimum Tolerance Level..... .00100
 Maximum significance of F to enter..... .50000
 Minimum significance of F to remove..... .50000
 Minimum increase in Rao's V..... .00000

Canonical Discriminant Functions

Maximum number of functions..... 1
 Minimum cumulative percent of variance... 100.00
 Maximum significance of Wilks' Lambda.... 1.0000

Prior probability for each group is .50000

----- Variables not in the analysis after step 0 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_I	1.0000000	1.0000000	.2440	1.450549
IGM_I	1.0000000	1.0000000	.7858	
IGG_I	1.0000000	1.0000000	.3325	.9919208
CD4_I	1.0000000	1.0000000	.0000	29.90654
CD8_I	1.0000000	1.0000000	.0010	15.44157
NK_I	1.0000000	1.0000000	.0181	6.756193
MC_I	1.0000000	1.0000000	.9308	

At step 1, CD4_I was included in the analysis.

	Wilks' Lambda	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
	.37573	1 1	18.0
Equivalent F	29.9065	1	18.0 .0000
RAO'S V	29.90654	1	.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 1 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD4_I	1.0000000	.0000	

Lampiran-7.3- Variables not in the analysis after step 1 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_I	.9872032	.9872032	.7298	
IGH_I	.9909179	.9909179	.6395	
IGG_I	.9887671	.9887671	.3685	32.41711
CD8_I	.9970261	.9970261	.0219	47.83420
NK_I	.9612466	.9612466	.3678	32.31866
MD_I	.8685510	.8685510	.2031	34.84380

F statistics and significances between pairs of groups after step 1
 Each F statistic has 1 and 18.0 degrees of freedom.

Group	1	2
	ABS-K	
Group		
2	LAG-K	29.907 .0000

At step 2, CD8_I was included in the analysis.

		Degrees of Freedom	Signif.	Between Groups
Milks' Lambda	.27341	2 1	18.0	
Equivalent F	22.5884	2	17.0	.0000
RAO'S V	47.83420	2		.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 2 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD4_I	.9970261	.0003	
CD8_I	.9970261	.0219	

----- Variables not in the analysis after step 2 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_I	.9374266	.9374266	.4472	50.33269
IGH_I	.9756876	.9756876	.5195	
IGG_I	.9843583	.9843583	.5292	
NK_I	.9306870	.9306870	.2645	53.33622
MD_I	.7754500	.7754500	.6686	

F statistics and significances between pairs of groups after step 2
 Each F statistic has 2 and 17.0 degrees of freedom.

Group	1	2
	ABS-K	
Group		
2	LAG-K	22.588 .0000

Lampiran 7.4

At step 3, NK_I was included in the analysis.

		Degrees of Freedom	Signif.	Between Groups
Wilks' Lambda	.25233	3	1	18.0
Equivalent F	15.8033	3	16.0	.0000
RAO'S V	53.33622	3		.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 3 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD4_I	.9607087	.0073	
CD8_I	.9653237	.0179	
NK_I	.9306870	.2645	

----- Variables not in the analysis after step 3 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_I	.9374247	.9182214	.4806	55.82480
IGM_I	.9736852	.9237767	.5180	
IGG_I	.9744453	.9215145	.4637	55.73207
MO_I	.5790211	.5790211	.2904	59.04733

F statistics and significances between pairs of groups after step 3
Each F statistic has 3 and 16.0 degrees of freedom.

Group	1	2
	AGS-K	LAE-K
Group 2		LAE-K
		15.303
		.0000

At step 4, MO_I was included in the analysis.

		Degrees of Freedom	Signif.	Between Groups
Wilks' Lambda	.23362	4	1	18.0
Equivalent F	17.3015	4	15.0	.0001
RAO'S V	59.04733	4		.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 4 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD4_I	.8640891	.0055	
CD8_I	.8701042	.0386	
NK_I	.6949350	.1452	
MO_I	.5790211	.2904	

Lampiran 7.5 Variables not in the analysis after step 4 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_I	.9253873	.3715858	.4410	62.50811
IGM_I	.8544349	.5092959	.7842	
IGG_I	.9365953	.3565304	.6463	

F statistics and significances between pairs of groups after step 4
 Each F statistic has 4 and 15.0 degrees of freedom.

Group	1	2
	ABS-K	LAS-K
		12.392
		.0001

.....

At step 5, IGA_I was included in the analysis.

	Wilks' Lambda	Equivalent F	RAO'S V	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
	.22358	9.72348	62.50811	5 1	18.0
				5	14.0 .0004
				5	.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 5 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
IGA_I	.9253873	.4410	
CD4_I	.8608762	.0114	
CD8_I	.9609084	.0623	
NK_I	.6927440	.1571	
MO_I	.5715858	.2792	

----- Variables not in the analysis after step 5 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGM_I	.8080564	.4906337	.9312	
IGG_I	.8843469	.5540309	.3359	

F statistics and significances between pairs of groups after step 5
 Each F statistic has 5 and 14.0 degrees of freedom.

Group	1	2
	ABS-K	LAS-K
		9.7235
		.0004

F level or tolerance or VIN insufficient for further computation.

Lampiran 7.6

Summary Table

Step	Action		Vars	Wilks'			Change			
	Entered	Removed		In	Lambda	Sig.	Rao's V	Sig.	in V	Sig.
1	CD4_I		1	.37573	.0000	29.90654	.0000	29.90654	.0000	
2	CDB_I		2	.27341	.0000	47.83420	.0000	17.92766	.0000	
3	NK_I		3	.25233	.0000	53.33622	.0000	5.50202	.0190	
4	MD_I		4	.23362	.0001	59.04733	.0000	5.71112	.0169	
5	IGA_I		5	.22358	.0004	62.50811	.0000	3.46078	.0628	

Classification Function Coefficients
(Fisher's Linear Discriminant Functions)

GROUP	=		1	2
			ABS-K	LAS-K
IGA_I			-.1477079	1.011056
CD4_I			.3036042	-2.401495
CDB_I			3.773741	.3690073
NK_I			-3.779934	-7.946833
MD_I			-.9490625	-1.395318
(constant)			-5.345580	-9.052402

Canonical Discriminant Functions

Function	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percent	Canonical :		Wilks' Lambda	Chi-squared	D.F.	Significance
				Correlation	Function				
1†	3.47267	100.00	100.00	.8811470	:	.2235800	23.219	5	.0003

† marks the 1 canonical discriminant functions remaining in the analysis.

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGA_I	-.24460
CD4_I	.75109
CDB_I	.54740
NK_I	.50590
MD_I	.43250

Structure Matrix:

Pooled-within-groups correlations between discriminating variables
and canonical discriminant functions
(Variables ordered by size of correlation within function)

	FUNC 1
CD4_I	.69170
CDB_I	.49702
NK_I	.32876
IGA_I	-.15233
IGG_I	-.06227
MD_I	.01114
IGN_I	.00997

Lampiran 7.7

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGA_I	-.3277268
CD4_I	.7650679
CDB_I	.9629417
NK_I	1.178500
MO_I	.1262120
(constant)	1.0493380

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1
1	1.76788
2	-1.76788

Test of equality of group covariance matrices using Box's M

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Group Label	Rank	Log Determinant
1 ABS-K	5	-3.348707
2 LAS-K	5	-3.466072
Pooled Within-Groups Covariance Matrix	5	-1.678453

Box's M	Approximate F	Degrees of freedom	Significance
31.121	1.4361	15,	1304.5 .1224

ampiran- 7.8 ----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number 2

Direct method: All variables passing the tolerance test are entered.

Minimum Tolerance Level..... .00100

Canonical Discriminant Functions

Maximum number of functions..... 1

Minimum cumulative percent of variance... 100.00

Maximum significance of Wilks' Lambda.... 1.0000

Prior probability for each group is .50000

Classification Function Coefficients

(Fisher's Linear Discriminant Functions)

GROUP	=	1	2
		ABS-K	LAS-K
IGA_I		-.1173927	1.341299
IGM_I		.9883471	1.263270
IGG_I		1.130643	-1.008718
CD4_I		.2992906	-2.408482
CDB_I		3.993001	.5620070
NK_I		-3.997886	-8.228340
MO_I		-1.051955	-1.467894
(constant)		-5.600032	-9.237811

Canonical Discriminant Functions

Function	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percent	Canonical Correlation	: After Function	Wilks' Lambda	Chi-squared	D.F.	Significance
1*	3.61640	100.00	100.00	.8850882	:	0	.2166189	22.179	7 .0024

* marks the 1 canonical discriminant functions remaining in the analysis.

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGA_I	-.30173
IGM_I	-.04167
IGG_I	.22093
CD4_I	.73574
CDB_I	.54055
NK_I	.50331
MO_I	.39503

Lampiran 7.9

Pooled-within-groups correlations between discriminating variables
and canonical discriminant functions
(Variables ordered by size of correlation within function)

	FUNC 1
CD4_I	.67781
CD8_I	.48705
NK_I	.32216
IGA_I	-.14928
IGG_I	.12344
IGM_I	.03416
MO_I	.01092

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGA_I	-.4042723
IGM_I	-.76749336E-01
IGG_I	.5929178
CD4_I	.7504514
CD8_I	.9508903
NK_I	1.172458
MO_I	.1152762
(constant)	1.008200

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1
1	1.80410
2	-1.80410

Test of equality of group covariance matrices using Box's M

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those
of the group covariance matrices.

Group Label	Rank	Log Determinant
1 ABS-K	7	-8.764303
2 LAG-K	7	-8.414953
Pooled Within-Groups Covariance Matrix	7	-5.310769

Box's M	Approximate F	Degrees of freedom	Significance
59.019	1.1919	28,	1129.0 .2260

Lampiran 7.10 ----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number.. 1

Number of Canonical Discriminant Functions.. 1

List of the 5 Variables used..

Variable Label

 TGA_I
 CD4_I
 CD8_I
 NK_I
 MD_I

Classification Results -

Actual Group		No. of Cases	Predicted Group Membership	
			1	2
Group 1		10	10	0
ARS-K			100.0%	.0%
Group 2		10	0	10
LAS-K			.0%	100.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 100.00%

Classification Processing Summary

20 Cases were processed.

0 Cases were excluded for missing or cut-of-range group codes.

0 Cases had at least one missing discriminating variable.

20 Cases were used for printed output.

Lampiran. 7.11 ----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number.. 2

Number of Canonical Discriminant Functions.. 1

List of the 7 Variables used..

Variable Label

 IGA_I
 IGM_I
 IGG_I
 CD4_I
 CD8_I
 NK_I
 MD_I

Classification Results -

Actual Group	No. of Cases	Predicted Group Membership	
		1	2
Group 1 ABS-K	10	10 100.0%	0 .0%
Group 2 LAS-K	10	0 .0%	10 100.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 100.00%

Classification Processing Summary

- 20 Cases were processed.
- 0 Cases were excluded for missing or out-of-range group codes.
- 0 Cases had at least one missing discriminating variable.
- 20 Cases were used for printed output.

Lampiran 8.1

disc group group(1,2)/VAR IGA_E IGM_E IGG_E CD4_E CDB_E NK_E MQ_E /met ras/PIN=0.5/PCUT=0.5/ana all/stat all.

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

20 (unweighted) cases were processed.
 0 of these were excluded from the analysis.
 20 (unweighted) cases will be used in the analysis.

Number of Cases by Group

GROUP	Number of Cases		Label
	Unweighted	Weighted	
1	10	10.0	ASG-K
2	10	10.0	LAG-K
Total	20	20.0	

Group Means

GROUP	IGA_E	IGM_E	IGG_E	CD4_E	CDB_E	NK_E	MQ_E
1	-10.10000	-3.04100	2.16700	-9.86700	-5.46800	-.43400	-6.63300
2	-10.00000	-8.57500	-1.06300	-11.40200	-5.03400	-1.66700	-7.53300
Total	-10.05000	-5.90800	.53200	-10.53450	-5.25100	-1.05050	-7.08300

Group Standard Deviations

GROUP	IGA_E	IGM_E	IGG_E	CD4_E	CDB_E	NK_E	MQ_E
1	1.63398	5.91502	1.79296	2.69771	1.46670	.94743	3.66175
2	1.47590	4.62427	1.04080	2.73323	1.53622	.97005	3.58638
Total	1.51629	5.39589	2.18664	2.75791	1.47866	1.08903	3.55768

Wilks' Lambda (U-statistic) and univariate F-ratio
 with 1 and 18 degrees of freedom

Variable	Wilks' Lambda	F	Significance
IGA_E	.99886	.2063E-01	.8874
IGM_E	.76816	5.433	.0316
IGG_E	.42579	24.27	.0001
CD4_E	.91848	1.598	.2224
CDB_E	.97733	.4175	.5263
NK_E	.66266	9.163	.0072
MQ_E	.98316	.3083	.5855

Lampiran 8.2

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number 1

Stepwise variable selection

Selection rule: Maximize Rao's V
 Maximum number of steps..... 14
 Minimum Tolerance Level..... .00100
 Maximum significance of F to enter..... .50000
 Minimum significance of F to remove..... .50000
 Minimum increase in Rao's V..... .00000

Canonical Discriminant Functions

Maximum number of functions..... 1
 Minimum cumulative percent of variance... 100.00
 Maximum significance of Wilks' Lambda... 1.0000

Prior probability for each group is .50000

----- Variables not in the analysis after step 0 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_E	1.0000000	1.0000000	.8874	
IGN_E	1.0000000	1.0000000	.0316	5.432748
IGG_E	1.0000000	1.0000000	.0001	24.27376
CD4_E	1.0000000	1.0000000	.2224	1.597634
CD8_E	1.0000000	1.0000000	.5263	
NK_E	1.0000000	1.0000000	.0072	9.163121
MD_E	1.0000000	1.0000000	.5855	

.....

At step 1, IGG_E was included in the analysis.

	Wilks' Lambda	Signif.	Degrees of Freedom	Between Groups
	.42579	18.0	1 1	
Equivalent F	24.2740	.0001	1	
RAO'S V	24.27376	.0000 (APPROX.)	1	

----- Variables in the analysis after step 1 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
IGG_E	1.0000000	.0001	

Lampiran 8.3

----- Variables not in the analysis after step 1 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_E	.9887358	.9887358	.6783	
IGM_E	.8261977	.8261977	.8471	
CD4_E	.9980000	.9980000	.5165	
CD8_E	.8836838	.8836838	.1350	30.39891
NK_E	.8314952	.8314952	.4942	25.48775
MO_E	.9967643	.9967643	.8591	

F statistics and significances between pairs of groups after step 1
 Each F statistic has 1 and 18.0 degrees of freedom.

Group	1
	ABS-K
Group	
2 LAG-K	24.274 .0001

At step 2, CD8_E was included in the analysis.

		Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.37191	2 1	18.0
Equivalent F	14.3550	2	17.0 .0002
RAO'S V	30.39891	2	.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 2 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
IGG_E	.8836838	.0001	
CD8_E	.8836838	.1350	

----- Variables not in the analysis after step 2 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_E	.9653971	.8626521	.5508	
IGM_E	.7848376	.6952175	.8850	
CD4_E	.9076512	.8036840	.2967	33.91928
NK_E	.7920069	.7014201	.7447	
MO_E	.9531227	.8448237	.8919	

F statistics and significances between pairs of groups after step 2
 Each F statistic has 2 and 17.0 degrees of freedom.

Group	1
	ABS-K
Group	
2 LAG-K	14.355 .0002

Lampiran 8.4

At step 3, CD4_E was included in the analysis.

		Degrees of Freedom	Signif.	Between Groups
Wilks' Lambda	.34467	3	1	18.0
Equivalent F	10.0502	3	16.0	.0006
RAO'S V	33.91928	3		.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 3 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
IGG_E	.8801376	.0002	
CD4_E	.9076512	.2767	
CD8_E	.8936840	.0947	

----- Variables not in the analysis after step 3 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IGA_E	.9366507	.7959673	.6935	
IGM_E	.7336725	.6924057	.9028	
NK_E	.7283766	.6960907	.8121	
MO_E	.9456255	.7738537	.9688	

F statistics and significances between pairs of groups after step 3
 Each F statistic has 3 and 16.0 degrees of freedom.

Group	Group	F	Signif.
1	2	10.050	.0006
1	3		
2	3		

F level or tolerance or VIN insufficient for further computation.

Summary Table

Step	Action	Vars	Wilks' In	Lambda	Sig.	Rao's V	Sig.	Change in V	Sig.	Label
1	IGG_E	1	.42579	.0001	24.27396	.0000	24.27396	.0000		
2	CD8_E	2	.37191	.0002	30.39891	.0000	6.12494	.0133		
3	CD4_E	3	.34467	.0006	33.91928	.0000	3.52038	.0606		

Classification Function Coefficients
 (Fisher's Linear Discriminant Functions)

GROUP	=	1	2
		ABS-K	LAS-K
IGG_E		1.984846	.1692467
CD4_E		-.9632977	-1.237634
CD8_E		-2.566233	-1.594771
(constant)		-14.61224	-11.95803

Lampiran 8.5

Canonical Discriminant Functions

Function	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percent	Canonical Correlation	After Function	Milks' Lambda	Chi-squared	D.F.	Significance
1*	1.88440	100.00	100.00	.8082747	0	.3466920	17.479	3	.0006

* marks the 1 canonical discriminant functions remaining in the analysis.

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGG_E	1.02186
CD4_E	.33315
CD8_E	-.56017

Structure Matrix:

Pooled-within-groups correlations between discriminating variables and canonical discriminant functions
(Variables ordered by size of correlation within function)

	FUNC 1
IGG_E	.84595
NK_E	.45111
IGM_E	.36622
CD4_E	.21703
CD8_E	-.11095
MO_E	.10769
IGA_E	.09955

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGG_E	.6970785
CD4_E	.1245251
CD8_E	-.3729818
(constant)	-1.019053

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1
1	1.30229
2	-1.30229

Test of equality of group covariance matrices using Box's M

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Group Label	Rank	Log Determinant
1 ABS-K	3	3.730940
2 LAG-K	3	2.662472
Pooled Within-Groups Covariance Matrix	3	3.355833

Box's M	Approximate F	Degrees of freedom	Significance
2.8643	.38997	6,	2347.5 .8858

Lampiran 8.6

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number 2

Direct method: All variables passing the tolerance test are entered.

Minimum Tolerance Level..... .00100

Canonical Discriminant Functions

Maximum number of functions..... 1

Minimum cumulative percent of variance... 100.00

Maximum significance of Wilks' Lambda.... 1.0000

Prior probability for each group is .50000

Classification Function Coefficients

(Fisher's Linear Discriminant Functions)

GROUP =	1	2
	ABS-K	LAS-K
IGA_E	-7.961999	-7.734222
IGM_E	-.2892646	-.2634061
IGG_E	7.607958	5.797042
CD4_E	-2.049665	-2.333317
CD8_E	-6.310064	-5.341552
NK_E	-9.832443	-10.11078
MD_E	-2.870866	-2.874697
(constant)	-88.60290	-83.41429

Canonical Discriminant Functions

Function	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percent	Canonical Correlation	: After Function	Wilks' Lambda	Chi-squared	D.F.	Significance
1*	1.92537	100.00	100.00	.8112721	0	.3418376	15.565	7	.0294

* marks the 1 canonical discriminant functions remaining in the analysis.

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGA_E	-.13470
IGM_E	-.05214
IGG_E	1.00834
CD4_E	.29257
CD8_E	-.55249
NK_E	.09629
MD_E	.00527

Structure Matrix:

Lampiran 8.7

Pooled-within-groups correlations between discriminating variables
and canonical discriminant functions
(Variables ordered by size of correlation within function)

	FUNC 1
IGG_E	.83691
NK_E	.51420
IGM_E	.39593
CD4_E	.21471
CDB_E	-.10976
MD_E	.09432
IGA_E	-.02440

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IGA_E	-.8651716E-01
IGM_E	-.9821908E-02
IGG_E	.6878448
CD4_E	.1077400
CDB_E	-.3679723
NK_E	.1057226
MD_E	.1455133E-02
(constant)	-1.970802

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1
1	1.31637
2	-1.31637

Test of equality of group covariance matrices using Box's M

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those
of the group covariance matrices.

Group Label	Rank	Log Determinant
1 ABS-K	7	8.119088
2 LAG-K	7	5.637300
Pooled Within-Groups Covariance Matrix	7	8.168191

Box's M	Approximate F	Degrees of freedom	Significance
23.220	.46874	28,	1129.0 .9919

Lampiran 8.8

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number.. 1

Number of Canonical Discriminant Functions.. 1

List of the 3 Variables used..

Variable Label

 TGG_E
 CD4_E
 CD8_E

Classification Results -

Actual Group		No. of Cases	Predicted Group Membership	
			1	2
Group	1	10	9	1
ABS-K			90.0%	10.0%
Group	2	10	1	9
LAG-K			10.0%	90.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 90.00%

Classification Processing Summary

- 20 Cases were processed.
- 0 Cases were excluded for missing or out-of-range group codes.
- 0 Cases had at least one missing discriminating variable.
- 20 Cases were used for printed output.

Lampiran 8.9

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number.. 2

Number of Canonical Discriminant Functions.. 1

List of the 7 Variables used..

Variable Label

IGA_E

IGM_E

IGG_E

CD4_E

CD8_E

NK_E

MO_E

Classification Results -

Actual Group	No. of Cases	Predicted Group Membership	
		1	2
Group 1 ABS-K	10	9 90.0%	1 10.0%
Group 2 LAS-K	10	1 10.0%	9 90.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 90.00%

Classification Processing Summary

20 Cases were processed.

0 Cases were excluded for missing or out-of-range group codes.

0 Cases had at least one missing discriminating variable.

20 Cases were used for printed output.

Lampiran 9.1

MAN IGA_I CD4_I CDB_I NK_I MD_I BY group(1,2)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/desig.

20 cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.
 0 cases rejected because of missing data.
 2 non-empty cells.

1 design will be processed.

CELL: NUMBER
 1 2
 Variable
 GROUP 1 2

Cell Means and Standard Deviations

Variable .. IGA_I

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	.020	.099	10	-.051	.091
GROUP	LAS-K	.271	.823	10	-.318	.860
For entire sample		.145	.585	20	-.128	.419

Variable .. CD4_I

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	.314	.264	10	.125	.503
GROUP	LAS-K	3.283	2.600	10	1.423	5.143
For entire sample		1.798	2.357	20	.695	2.901

Variable .. CDB_I

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	2.894	2.913	10	.811	4.978
GROUP	LAS-K	-.086	.083	10	-.145	-.025
For entire sample		1.404	2.522	20	.224	2.585

Variable .. NK_I

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	.257	1.154	10	-.568	1.082
GROUP	LAS-K	4.506	4.170	10	1.523	7.489
For entire sample		2.381	3.690	20	.654	4.109

Variable .. MD_I

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	5.820	3.203	10	3.529	8.111
GROUP	LAS-K	8.744	4.853	10	5.273	12.216
For entire sample		7.282	4.274	20	5.282	9.282

Lampiran 9.2

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN 1 *****

EFFECT .. GROUP

Multivariate Tests of Significance (S = 1, N = 1 1/2, N = 6)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.66481	6.08363	5.00	14.00	.003
Hotellings	2.17272	6.08363	5.00	14.00	.003
Wilks	.31519	6.08363	5.00	14.00	.003
Roys	.66481				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	2.17272	100.00000	100.00000	.82753

Univariate F-tests with (1,18) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGA_I	.31543	6.18981	.31543	.34388	.91728	.351
CD4_I	44.07234	61.47611	44.07234	3.41534	12.90423	.002
CD8_I	44.40406	76.41731	44.40406	4.24541	10.45932	.005
NK_I	90.26230	168.50796	90.26230	9.36155	9.64181	.006
MD_I	42.77247	304.29379	42.77247	16.90521	2.53014	.129

Averaged F-test with (5,90) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 5	221.92660	616.88499	44.38532	6.85428	6.47265	.000

ampiran 10.1

MAN 166_E CD4_E CDB_E BY group(1,2)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/desig.

20 cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.
 0 cases rejected because of missing data.
 2 non-empty cells.

1 design will be processed.

		CELL NUMBER				
		1	2			
Variable						
GROUP		1	2			

Cell Means and Standard Deviations

Variable .. 166_E						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	4.301	3.559	10	1.755	6.847
GROUP	LAS-K	-.180	.176	10	-.306	-.054
For entire sample		2.061	3.361	20	.488	3.634

Variable .. CD4_E						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	9.505	2.599	10	7.646	11.364
GROUP	LAS-K	14.682	3.519	10	12.164	17.199
For entire sample		12.093	4.015	20	10.214	13.972

Variable .. CDB_E						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	ABS-K	14.032	3.764	10	11.340	16.725
GROUP	LAS-K	8.028	2.450	10	6.276	9.781
For entire sample		11.030	4.364	20	8.988	13.072

lampiran 10.2

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN *****

EFFECT .. GROUP

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 7)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.81419	23.36973	3.00	16.00	.000
Hotellings	4.38182	23.36973	3.00	16.00	.000
Wilks	.18581	23.36973	3.00	16.00	.000
Roys	.81419				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	4.38182	100.00000	100.00000	.90232

Univariate F-tests with (1,18) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
IGG_E	100.39996	114.26173	100.39996	6.34788	15.81631	.001
CD4_E	133.99342	172.25511	133.99342	9.56973	14.00180	.001
CD8_E	180.24516	181.52124	180.24516	10.08451	17.87346	.001

Averaged F-test with (3,54) D. F.

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 3	414.63855	468.03813	138.21285	8.66737	15.94634	.000

Lampiran 11.1

TEKNIK PEMBUATAN SEDIAAN HISTOLOGI

➤ Pembuatan sediaan rutin, tahap-tahap yang harus dilakukan:

1. Pengambilan bahan: paling lambat 4 jam posmortem, untuk menghindari degenerasi oleh autolisis. Pemotongan dilakukan dengan menggunakan pisau tajam dan tidak boleh ditekan saat memotongnya (tebal 2-5 mm).
2. Fiksasi: bertujuan untuk menghindari terjadinya perubahan-perubahan posmortem, mengeraskan bahan agar mudah melakukan pemotongan, membunuh kuman penyakit yang mungkin masih ada, menonjolkan perbedaan refraksi komponen-komponen jaringan, meningkatkan affinitas protoplasma terhadap bahan-bahan cat tertentu. Bahan yang sering dipakai adalah buffer formalin, bouin, zenker, carnoy dll.
3. Dehidrasi: memasukkan bahan kedalam alkohol dengan konsentrasi yang meningkat mulai 70% sampai absolut.
4. Clearing: agar bahan menjadi transparat, misalnya: xylol, toluol, chloroform benzene atau cedar oil.
5. Embedding: merupakan suatu penyangga agar bahan dapat dipotong dengan mikrotom tanpa menimbulkan distorsi yang berarti terhadap susunan jaringan. Untuk itu diperlukan proses infiltrasi ke dalam jaringan dengan menggunakan parafin.
6. Sectioning: menggunakan mikrotom. Hasil irisannya disebut ribbon, ditempel pada gelas obyek yang sudah diberi perekat dengan putih telur+ gliserin atau polilisin, dikeringkan di dalam oven.
7. Staining: berguna untuk meningkatkan kontras alamiah untuk menonjolkan sel, komponen jaringan dan bahan ekstrinsik yang hendak diteliti. Untuk itu dilakukan deparafinisasi dengan xylol, hidrasi menggunakan alkohol dari konsentrasi tinggi ke rendah dan akhirnya di masukkan ke dalam air, dan siap untuk dilakukan pengecatan.
8. Mounting: setelah selesai proses pengecatan, kelebihan bahan cat dihilangkan dengan air atau alkohol. Dehidrasi alkohol dengan konsentrasi

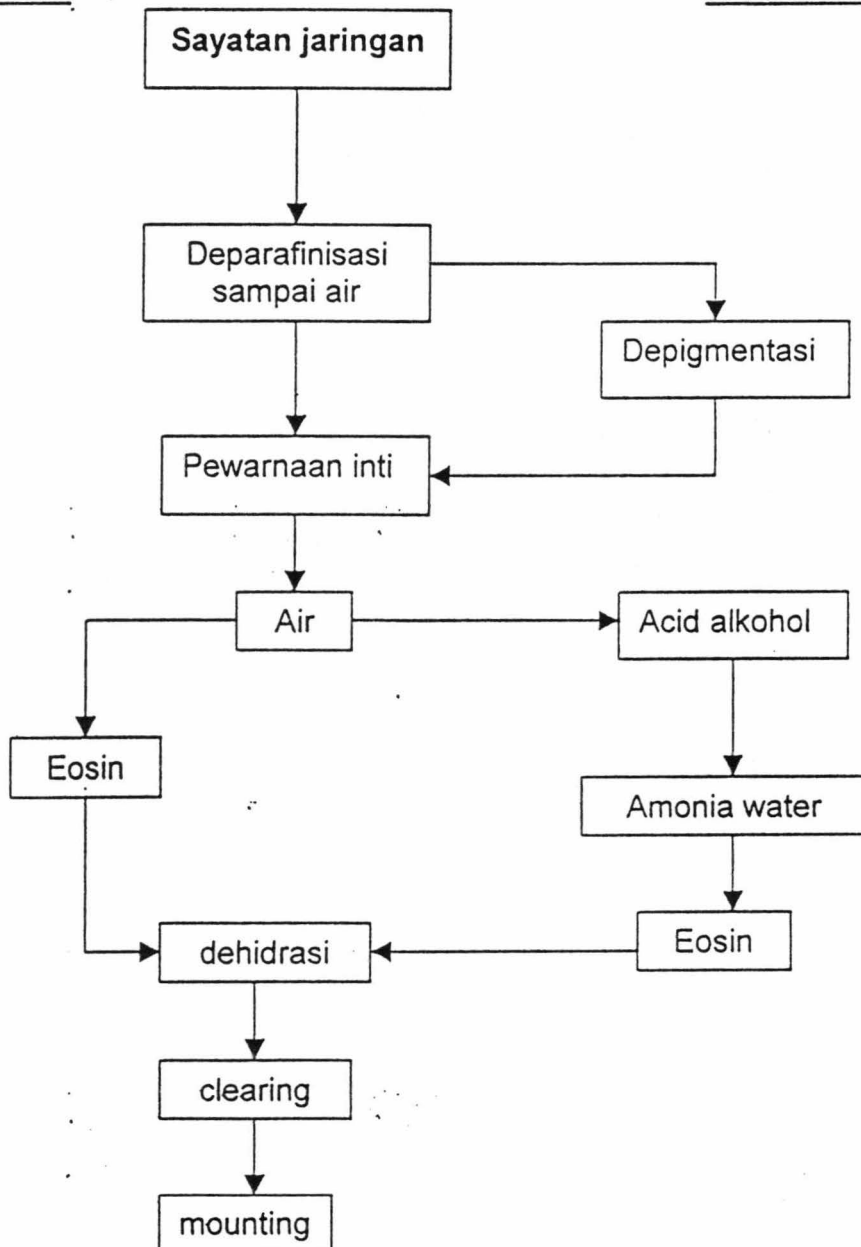
Lampiran 11.2

yang meningkat, kemudian masukkan ke dalam xylol, tetesi dengan enthelan dan tutup dengan gelas penutup.

➤ Skema pewarnaan HAEMATOKSILIN-EOSIN (rutin)

PROGRESIVE

REGRESSIVE



Lampiran 12.1

TEKNIK PEMBUATAN IMUNOHISTOKIMIA

1. Pembuatan preparat segar, yaitu:
 - a. Sampel yang telah dipotong dan ditempel pada gelas obyektif direndam dalam acetone 10 menit, dikeringkan di udara terbuka.
 - b. Rendam dalam PBS selama 5 menit.
 - c. Beri tanda dengan pena parafin.
 - d. Tetesi dengan H_2O_2 3% selama 2 menit, cuci dengan PBS (3x) @ 2-3 menit.
 - e. Tetesi dengan antibodi primer selama 30 menit, kemudian cuci dengan PBS (3x) @ 2-3 menit.
 - f. Tetesi dengan antibodi sekunder (*Biotinilated antibody label/ link Ab*) selama 15 menit, cuci dengan PBS (3x) @ 2-3 menit. Buat larutan chromogen (3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride), 2 ml larutan substrat + 1 tetes H_2O_2 3% dan simpan di lemari pendingin.
 - g. Tetesi dengan avidin/streptavidin selama 15 menit, kemudian cuci PBS (3x) @ 2-3 menit.
 - h. Tetesi chromogen selama 15 menit, cuci PBS (3x) @ 2-3 menit.
 - i. Rendam dengan hematoksilin dari Meyer (tidak mengandung alkohol) 5-8 menit, cuci dengan air kran dan rendam sampai berwarna biru.
 - j. Tetesi entelan dan tutup dengan gelas penutup.
 - k. Lakukan pemeriksaan dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 400x.

2. Pembuatan preparat dengan menggunakan parafin, yaitu:
 - a. Deparafinisasi: 2-3x rendam xylol @ 5-6 menit (parafin pada sediaan hilang); 2-3x rendam alkohol absolut @ 3 menit; 2-3x rendam alkohol 95% @ 2-3 menit; 2-3x rendam alkohol 80% @ 2-3 3x alkohol 70% @ 2-3 menit, kemudian rendam dengan air.
 - b. Rendam dalam air.
 - c. Keringkan dengan tissue, beri tanda dengan pena parafin.
 - d. Rendam dalam PBS selama 5 menit.

Lampiran 12.2

- e. Tetesi trypsin 0.1% selama 6 menit dalam suhu 37°C, cuci PBS (3x) @ 2-3 menit.
 - f. Tetesi dengan H₂ O₂ 3% selama 2 menit, cuci dengan PBS (3x) @ 2-3 menit.
 - g. Selanjutnya sama seperti pembuatan sediaan segar di atas (e-k).
3. Sediaan hapusan (fiksasi buffer formalin/ aceton)
- a. Rendam dengan PBS selama 5 menit.
 - b. Buat larutan antibodi monoklonal.
 - c. Tetesi dengan H₂O₂ 3% selama 2 menit, cuci PBS (3x) @ 2-3 menit.
 - d. Selanjutnya sama seperti pembuatan sediaan segar di atas (e-k).