

DISERTASI

EKSTRAK METANOL *CENTELLA ASIATICA* SEBAGAI IMUNOMODULATOR AJUVAN PADA PERUBAHAN BEBERAPA VARIABEL RESPONS IMUN TIKUS PUTIH

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS
DENGAN PARADIGMA PSIKONEUROIMUNOLOGIS
BERKONSEP PADA IMUNOMODULATOR AJUVAN**



KK
Dis K 56/02
SAL
e.



WBM. TAIB SALEH

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

**EKSTRAK METANOL *CENTELLA ASIATICA* SEBAGAI
IMUNOMODULATOR AJUVAN PADA PERUBAHAN
BEBERAPA VARIABEL RESPONS IMUN TIKUS PUTIH**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS
DENGAN PARADIGMA PSIKONEUROIMUNOLOGIS
BERKONSEP PADA IMUNOMODULATOR AJUVAN**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran

Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
dan telah dipertahankan di hadapan
Dewan Ujian Doktor Terbuka

Pada hari : Senin
tanggal 7 Agustus 2000
pukul 10.00 WIB.



Oleh :

WBM. TAIB SALEH
NIM. 099411713D

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 15 FEBRUARI 2001

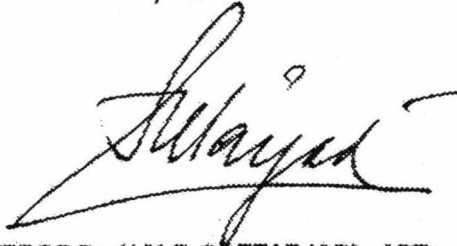
Oleh:

Promotor



(PROF Dr R PITONO SOEPARTO, dr Sp A (K))
NIP. 130 206 153

Ko-promotor



(PROF Dr H M F SOETARJADI, APT)
NIP. 130 432 617

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



PROF Dr JULIATI HOOD ALSAGAFF, dr MS Sp PA
NIP. 130 517 159

**Telah diuji pada ujian tertutup
Tanggal 10 Juli 2000**

SUSUNAN PANITIA PENGUJI DISERTASI

- Ketua** : Prof S Hood Alsagaff, dr SpP (K).
- Anggota** : 1. Prof Dr R Pitono Soeparto, dr SpKA (K).
2. Prof Dr HMF Soetarjadi, Apt.
3. Prof Dr Asri Rasyad, dr MSc.
4. Prof Purnomo Suryohudoyo, dr.
5. Prof Dr PG Konthen, dr SpDP (KAI).
6. Prof Dr Noor Cholies Zaini, Apt.
7. Prof Dr Benjamin P Margono, dr SpP (K).
8. Prof Dr Soegeng Soekamto M, dr SpPA MS.
9. R Widodo JP, dr MPH Dr PH.
10. Dr Suhartono Taat Putra, dr MS.

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 6110 / JO3 / PP / 2000
Tanggal : 20 JULI 2000**

**Kusembahkan untuk :
Alammater
Guru - guruku
Isteri dan keempat putra putriku tercinta
Almarhumah Ibu dan almarhum ayah tercinta
Ibu dan almarhum ayah mertua
Serta Saudara-saudara dan teman - temanku**

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan segala kerendahan hati saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya yang telah dilimpahkan kepada hambaNya, sehingga saya mendapatkan kekuatan serta tuntunan-Nya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Pertama-tama, ucapan terima kasih ini saya tujukan kepada Prof Dr R Pitono Soeparto, dr SpKA (K) selaku promotor dan Prof Dr Thomas Kardjito, dr SpP (K) selaku mantan promotor, yang telah membimbing, membantu, dan memberikan dorongan dari awal hingga selesainya penelitian dan penulisan disertasi ini.

Kepada Prof Dr H M F Soetarjadi Apt, selaku ko-promotor yang dengan sangat sabar dan penuh perhatian membimbing, memberi dorongan serta menambah wawasan ilmu tanaman obat mulai dari menyiapkan bahan baku, pelaksanaan sampai selesainya penelitian ini, saya sampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Kepada Rektor Universitas Airlangga Prof H Soedarto, dr DTM &H, PhD dan mantan Rektor Prof H Bambang Rahino Setokoesoemo, dr yang telah memberi ijin, kesempatan serta berkenan menerima saya sebagai mahasiswa Pasca-sarjana di Universitas Airlangga periode 1994 / 1995, saya ucapkan terima kasih.

Kepada Prof Dr Muhammad Amin, dr SpP (K) Direktur Program Pasca-sarjana Universitas Airlangga Surabaya dan mantan Direktur Program Pasca-sarjana Prof Dr H Soedijono Tirtowidardjo, dr SpTHT serta staf, yang telah memberi kesempatan serta dorongan kepada saya untuk mengikuti pendidikan

di Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, saya ucapkan terima kasih.

Terima kasih saya sampaikan kepada Prof Dr HMS Wiyadi, dr SpTHT Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Prof Dr Askandar Tjokroprawiro, dr SpPD mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberi izin kepada saya untuk mengikuti program doktor.

Kepada Prof S. Hood Alsagaff, dr SpP(K) selaku kepala laboratorium Ilmu Penyakit Paru Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta semua staf yang telah memberi izin serta menyetujui agar saya dapat mengikuti pendidikan Pascasarjana. Kesediaan semua staf yang dengan sukarela bersedia membantu menyelesaikan pekerjaan rutin yang saya tinggalkan selama mengikuti pendidikan pascasarjana. Untuk semua ini, saya ucapkan terima kasih.

Terima kasih saya ucapkan untuk Prof Dr Fasich, Apt Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, beserta staf dan Dr Wahyu Dyatmiko, Apt selaku kepala jurusan Biologi Farmasi yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk bekerja di Laboratorium hewan coba serta menggunakan fasilitas di Fakultas Farmasi dalam rangka mengikuti program pendidikan doktor. Kepada Dr Muliahadi Santoso, Apt selaku kepala Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga yang telah membantu saya mempersiapkan bahan yang akan dipergunakan dalam penelitian ini.

Kepada Prof Dr Noor Cholies Zaini, Apt selaku Direktur Lembaga Penelitian Universitas Airlangga yang ikut membantu serta mendorong hingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan semestinya. Kepada sejawat Widodo Jatim Pudjirahardjo, dr Dr PH. yang telah banyak meluangkan waktu untuk

membimbing serta mengoreksi seluruh isi disertasi ini dengan teliti serta memberi saran perbaikan yang sangat berguna, saya ucapkan terima kasih.

Ucapan terima kasih kepada kepala Laboratorium Patologi Anatomi Prof Dr Juliati Hood Alsagaff, dr MS SpPA FIAC dan mantan Kepala Laboratorium Patologi Anatomi Prof Dr Roemwerdiniadi Soedoko, dr SpPA beserta staf terutama kepada sdr Prof Soegeng Sukanto MS, dr MS SpPA PhD dan Dr Watadianto, dr MS SpPA serta seluruh staf Patologi Klinik yang bertugas di Gramik dan Seksi / Divisi Patobiologi Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran-RSUD.Dr Sutomo Surabaya yang telah membantu serta memberi fasilitas hingga penelitian ini dapat diselesaikan. Kepada Dr Suhartono Taat Putra, dr MS; Dr I Ketut Suidiana MS; sdri. Tania Ardiani Saleh, dra MS yang telah meluangkan waktu dan tenaga serta membantu menyelesaikan hatap-tahap akhir dari penelitian ini sehingga terwujud sebagai bahan disertasi.

Kepada sdri. Eka Kusumowarhdani, dr SpPA; sdr. Koesoemowardoyo, dr MS SpPA; sdr. Ario Djatmiko, dr SpB; sdr. Drs Eko yang telah banyak memberi bantuan, berupa kemudahan di laboratoium dalam menyelesaikan disertasi ini.

Kepada sdr. Abdul Kholik, Ahli Madya bidang statistik, staf Laboratorium Komputasi Jurusan Statistik Fakultas MIPA ITS yang telah membantu dalam analisis data penelitian disertasi ini, saya ucapkan terima kasih atas segala bantuannya.

Kepada semua anggota tim penguji yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu terutama Prof Dr Asri Rasyad, dr, MSc dari YARSI Jakarta saya mengucapkan terima atas kesempatan dan waktu yang telah disediakan untuk

menguji.

Kepada Prof Dr Mutmainah, drg yang telah membantu mengoreksi dan memperbaiki susunan bahasa Indonesia dalam buku disertasi ini, saya ucapkan terima kasih.

Pada kesempatan ini, tak lupa saya ucapkan terima kasih kepada segenap bapak dan Ibu guru Sekolah Rakyat Tarempa, Tanjungpinang, Dabo-Singkep, SMP Negeri 1, SMA Negeri ABC Tanjungpinang dan khususnya Dosen serta Guru Besar Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Program Pasca-sarjana Universitas Airlangga Surabaya yang telah mendidik serta membimbing saya hingga menjadi dokter, ahli penyakit Paru dan dapat pula menyelesaikan program doktor.

Terima kasih yang tidak terhingga saya sampaikan kepada Ibu tercinta almarhumah Hj Habibah binti Wan Ja'kub serta almarhum ayahanda H Mochammad Saleh bin H Wan Larak Abdurrachim yang semasa hidup beliau telah mencurahkan segenap kasih sayang, membimbing, mendoakan, merawat dan mendidik saya sejak kecil sampai dewasa, semoga Allah SWT mengampuni segala dosa beliau dan memberi tempat yang layak bagi keduanya di alam barzah. Tidak lupa saya mengucapkan terima kasih kepada semua saudara, terutama kepada kakak dan abang Hj Arba'yah Daikanakemalawati, Hj Rohana Salasiah Riauwina, Rohani Riauwati dan abang H Wan Hasyim Jacob Rahim, abang Wan Larak Muhammad Sahab dan adik H Wan Muhammad Taufik hidayat yang telah membantu moral maupun material serta memberi semangat kepada saya selama menempuh pendidikan hingga menjadi dokter. Semoga

jasa-jasa beliau mendapat balasan yang melimpah dari Allah SWT.

Terima kasih yang tidak terhingga saya sampaikan kepada mertua saya ibu Hj M Roestam serta almarhum Bapak H M Roestam dan kepada semua saudara ipar serta isteri tercinta Hj Trisnowati, dr SpM (K) beserta anak-anak yang kusayangi, Deasy Miranti SE, Moch Reza Norman, Moch Novan Affandi dan sikecil Mia Rahmadiana yang telah mendorong serta dengan sabar membantu, memberi semangat serta memanjatkan doa untuk keberhasilan dalam menempuh pendidikan hingga selesai meraih gelar doktor.

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, memberi semangat, memanjatkan doa, agar usaha saya berhasil. Untuk itu saya sekeluarga mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga atas semua bantuan yang telah diberikan.

Akhirrulkalam, semoga Allah SWT melimpahkan rahmat serta taufik dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah membantu saya dengan ikhlas dalam menyelesaikan disertasi ini.

Amien amien ya Robbal aalamin.

Wassalam

RINGKASAN

Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* dengan tujuan untuk melihat perubahan respons imun daerah parakorteks kelenjar getah bening tikus putih setelah diberi perlakuan dengan EMCA. Ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA) merupakan bahan perlakuan yang hasilnya akan dibandingkan dengan kontrol larutan garam faali (plasebo) dan grup kontrol fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* (FTECA). Garam faali dipergunakan sebagai kontrol pertama, dengan tujuan untuk melihat apakah EMCA dapat meningkatkan respons imun yang lebih besar, bila dibandingkan dengan individu yang hanya mendapat garam faali (tidak diberi EMCA). FTECA sebagai kontrol kedua dengan tujuan untuk melihat apakah ada perbedaan, apabila seseorang diberi EMCA yaitu suatu ekstrak kasar tanaman pegagan atau *Centella asiatica* yang masih berisi seluruh komponen dibandingkan dengan FTECA yaitu suatu bahan yang hanya berisi 3 komponen dari pegagan atau *Centella asiatica*. FTECA adalah obat yang telah dipasarkan secara luas. Metanol dipergunakan sebagai bahan ekstraktor sederhana, dan merupakan bahan yang paling sering dipergunakan untuk ekstraksi atau fraksinasi komponen yang terdapat di dalam tanaman (Robinson T, 1991).

Tanaman obat berkhasiat *Centella asiatica* yang dipergunakan sebagai sumber ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA) berasal dari Materia Medika Batu-Malang di Jawa Timur, yaitu tempat pembibitan tanaman obat milik Departemen Kesehatan Propinsi Jawa Timur, sedangkan grup kontrol fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* (FTECA) mengandung 3 komponen aktif

yaitu asiaticoside 40% (4 mg), asiatic acid 30% (3 mg) dan madecassic acid 30% (3 mg) untuk setiap tablet dengan berat rerata 200 mg.

Kelompok kontrol plasebo adalah larutan garam faali, yang dipergunakan sebagai pelarut EMCA dan FTECA. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara grup yang memperoleh perlakuan EMCA bila dibandingkan dengan kontrol atau plasebo dan ada perbedaan yang bermakna antara grup kontrol FTECA bila dibandingkan dengan kontrol-plasebo. Dosis perlakuan ikut menentukan modulasi perubahan respons imun serta pola respons imun. Grup EMCA membangkitkan respons imun Th1 diwakili CD4⁺T, makrofag dan (IFN- γ) yang lebih dominan disertai supresi CD8⁺T. Sedangkan grup FTECA cenderung menghasilkan respons imun Th1 yang diwakili CD4⁺T, makrofag serta peningkatan CD8⁺T yang sangat dominan, tetapi supresi pada sekresi IFN- γ .

Grup EMCA membangkitkan respons imun daerah parakorteks kelenjar getah bening melalui jalur eksogen dengan cara meningkatkan ekspresi MHC kelas II makrofag. Sebaliknya grup FTECA menggunakan jalur endogen dengan bantuan liposom, sehingga makrofag mampu mengekspresikan MHC kelas I yang lebih dominan dibandingkan dengan MHC kelas II.

Key word : imunomodulator adjuvant, methanol extract of Centella asiatica

(EMCA), immune response, mesenterical lymphnode, rat

ABSTRACT

This research is an in vivo research to observe the changes of immune response of reaction of white's lymphnode paracortex area after having the treatment. *Centella asiatica* methanol extract (EMCA) is a treatment material which the result will be compared to *Centella asiatica* extract standardized fraction control group (FTECA) and normal saline solution control (placebo). Methanol is a mostly used material for component fractination that can be found in the herb (Robinson T, 1991).

A special quality herb of *Centella asiatica* which was used as the sources of *Centella asiatica* methanol extract (EMCA) comes from Materia Medika of Batu-Malang, East Java. While the *Centella asiatica* extract standardized fraction control group (FTECA) that contains 3 active components which are asiaticoside 40% (4 mg), asiatic acid 30% (3 mg) and madecassic acid 30% (3 mg) for each tablet with average weight of 200 mg.

The placebo control group is treated with normal saline solution , which was used to dissolve EMCA and FTECA. The research result shows that there is significant difference between the group which recieved EMCA treatment if compared with placebo control using normal saline solution and there was also significant difference between FTECA is the second control group if compared with placebo is the first control group.

The treatment dosage also determine the value of the increase of immune response and immune response pattern. EMCA group caused the occurrence of Th1 immune response and represented by lymphocyte CD4⁺T, macrophage

cells ($M\emptyset$) and gamma interferron ($IFN-\gamma$) which was more dominant along with the suppression of lymphocyte $CD8^+T$. Whereas the FTECA group tends to caused the Th1 immune response and represented by lymphocyte $CD4^+T$, macrophage cell and the increase of lymphocyte $CD8^+T$ was very dominant, but suppression on gamma interferron ($IFN-\gamma$) secretion.

EMCA group increases the immune response of lymphnode paracortex area through exogen pathway with more HMC class II expression by macrophage. Incontrast FTECA group should use endogen pathway with more MHC class I expression.

Key word : imunomodulator adjuvant, methanol extract of Centella asiatica

(EMCA), immune response, mesenterical lymphnode, rat

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan.....	xi
Abstract	xiii
Daftar isi	xv
Bab 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	7
Bab 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Resistensi Host-Parasit dan Parasit-Antibiotik.....	8
2.2 Tanaman Berkhasiat Obat	11
2.3 Triterpenoid Saponin	16

2.4	Khasiat Triterpenoid Saponin dan Beberapa Tanaman Obat	17
2.5	Khasiat Triterpenoid Saponin <i>Centella asiatica</i>	21
2.6.	<i>Centella asiatica</i> Sebagai Obat Tradisional	22
2.7	Kelenjar Getah Bening	23
2.8	Sistem Imun Tikus	34
2.9	Sistem Imun Tubuh Manusia	36
Bab 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	45
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	45
3.2	Hipotesis Penelitian	48
Bab 4	METODE PENELITIAN	50
4.1	Metode Penelitian	50
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Sampling ..	53
4.3	Identifikasi dan Pengukuran Variabel Penelitian	55
4.4	Tatalaksana Penelitian	60
4.5	Tempat dan Waktu Penelitian	62
4.6	Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	64
4.7	Pengukuran Respons Imun Parakorteks Kelenjar Getah Bening	64
4.8	Teknik Analisis Data	65

Bab 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL	
PENELITIAN	68
5.1 Hasil Penelitian	68
5.2 Analisis Hasil Penelitian	76
5.2.1 Hasil uji homogenitas sampel	76
5.2.2 Hasil uji normalitas.....	76
5.2.3 Hasil uji keajegan / konsistensi pengamatan	76
5.2.4 Hasil uji perbedaan kedua pengamatan pada sampel kelompok grup EMCA dan grup FTECA	78
5.2.5 Perubahan 7 variabel parakorteks setelah terpapar EMCA dan dibandingkan dengan kontrol plasebo	80
5.2.6 Perubahan 7 variabel parakorteks setelah terpapar FTECA dan dibandingkan dengan kontrol plasebo.....	82
5.2.7 Peningkatan respons imun karena paparan EMCA dengan dosis yang berbeda	84
5.2.8 Diskriminan untuk identifikasi variabel pembeda	85
5.2.9 Pembuatan pola perubahan respons Imun	87
 Bab 6 PEMBAHASAN	 90
6.1 Pembahasan	90
6.1.1 Pembuktian hipotesis.....	100
6.1.2 Mekanisme peningkatan respons imun EMCA dan FTECA.....	104

Bab 7 SIMPULAN DAN SARAN	114
7.1 Simpulan	114
7.2. Saran.....	116
PUSTAKA ACUAN	117
LAMPIRAN	132

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 : Grafik yang menjelaskan secara teori morbiditas dan mortalitas penyakit pada suatu populasi	8
Gambar 2.2 : <i>Centella asiatica</i> (Linn) Urban	11
Gambar 2.3 : Kelenjar getah bening	23
Gambar 5.1 : Grafik menunjukkan berat tablet sumber FTECA sebagai garis lurus setelah di plot pada kertas probabilitas normal	68
Gambar 5.2 : Grafik menunjukkan berat tikus merupakan garis Lurus, setelah di plot pada kertas semilogaritmik	69
Gambar 5.3 : Gambar sel limfosit CD8 ⁺ T pada kelompok FTECA	69
Gambar 5.4 : Gambar sel limfosit CD4 ⁺ T pada kelompok EMCA	71
Gambar 5.5 : Gambar makrofag pada kelompok FTECA	72
Gambar 5.6 : Gambar CD4 ⁺ T dengan sekresi IFN- γ (EMCA)	73
Gambar 5.7 : Limfoblas-B matur dengan sekresi sIgA, sIgG dan sIgM grup EMCA dan grup FTECA	74-75
Gambar 5.8 : Grafik rerata 7 variabel kelompok 1,2,3 grup EMCA dan kontrol plasebo daerah parakorteks	82
Gambar 5.9 : Grafik rerata 7 variabel kelompok 1,2,3 grup FTECA dan kontrol plasebo daerah parakorteks	84
Gambar 5.10 Grafik pola selisih perbedaan respons imun pato-biologik dari variabel di daerah parakorteks kelenjar getah bening grup EMCA	89

DAFTAR SKEMA

Skema 2.1 : Alur yang menjelaskan hubungan latar belakang masalah dengan kemungkinan pemecahannya	9
Skema 3.1 : Kerangka Konseptual Penelitian	45
Skema 4.1 : Rancangan desain uji respons imun tikus putih sebelum dan sesudah diberi perlakuan FTECA, EMCA dan kelompok kontrol	51
Skema 4.2 : Rumus yang dipergunakan untuk menghitung besar sampel pada penelitian	54
Skema 4.3 : Hubungan antar variabel dalam penelitian ini	56
Skema 4.4 : Waktu pelaksanaan kegiatan	63

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Faktor-faktor yang ikut mempengaruhi diferensiasi sel CD4 ⁺ T ke dalam fenotipe Th1 dan Th2	41
Tabel 5.1 Uji homogenitas berat badan tikus grup EMCA, terdiri dari kelompok 1,2 , 3 dan kontrol plasebo	77
Tabel 5.2 Uji homogenitas berat badan tikus grup FTECA, terdiri dari kelompok 1,2, 3 dan kontrol plasebo	77
Tabel 5.3 Rerata dan simpang baku 7 variabel EMCA daerah parakorteks dibaca oleh peneliti dan pendamping	78
Tabel 5.4 Rerata dan simpang baku 7 variabel FTECA daerah parakorteks dibaca oleh peneliti dan pendamping	79
Tabel 5.5 Rerata dan simpang baku 7 variabel grup EMCA, dibandingkan dengan kontrol plasebo daerah parakorteks	81
Tabel 5.6 Rerata dan simpang baku 7 variabel grup FTECA dibandingkan dengan kontrol plasebo daerah parakorteks	83
Tabel 5.7 Rekapitulasi 7 variabel daerah parakorteks setelah perlakuan dengan EMCA	86
Tabel 5.8 Rekapitulasi 7 variabel daerah parakorteks setelah perlakuan dengan FTECA	86
Tabel 5.9 Koefisien Fisher dari grup EMCA	87

DAFTAR ISTILAH

Alum adalah suatu senyawa kimia yang terdiri dari dua molekul asam sulfat yang berikatan pada logam aluminium dan kalium atau suatu ikatan dua molekul asam sulfat pada logam aluminium dan ammonia bersifat mengeringkan atau *astringent* kuat .

Ajuvan atau stimulator ajuvan: Adalah material yang dapat meningkatkan respons imun, bila diberikan bersamaan dengan antigen (Playfair JHL, 1992).

***Centella asiatica* atau *Hydrocotyle asiatica*:** Adalah tanaman yang termasuk famili Umbelliferae atau Apiaceae dengan nama lokal pegagan, pegaga atau antanan (Heyne K, 1987).

DAB atau 3,3' diamino benzidine adalah zat warna coklat yang dipergunakan pada pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini.

Daerah parakorteks kelenjar getah bening: adalah daerah di parakorteks kelenjar getah bening tempat terjadinya peningkatan aktivitas sel-sel imunokompeten terutama limfosit-T, sebagian kecil limfosit-B matur dan makrofag terdapat disini.

Dalton adalah suatu unit ukuran massa yang sering dipergunakan dalam biologi yang besarnya = 1/12 massa atom karbon-12 atau = $1,661 \times 10^{-24}$ gram (Roger Grant, 1988).

Ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA): Adalah semua komponen atau senyawa kimia dari tanaman *Centella asiatica* yang dapat dilarutkan oleh metanol

Fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* (FTECA): Adalah suatu campuran

yang terdiri dari 3 komponen atau senyawa kimia dalam konsentrasi tertentu yaitu asiaticoside (40%), asiatic acid (30%) dan madecassoside (30%) yang berasal dari tanaman *centella asiatica*.

Hapten adalah bagian dari suatu antigen yang berisi gugus yang menentukan sifat spesifik (Taber's Med dict, 184)

Imunomodulator adalah suatu agen atau bahan yang dapat mengatur secara menyeluruh respons, meliputi penguatan respons imun atau imunopotensiasi dan penekanan respons imun atau imunosupresi (Katz, 1993).

Imunopatologis, adalah perubahan imunologis yang merugikan dan perubahan tersebut sebagai penyebab penyakit, misalnya: penyakit autoimun, penyakit alergi (Ogra PL ,2000)

Imunopatobiologis, adalah perubahan respons imun yang negatif, tetapi tidak menempatkan perubahan tersebut sebagai kausa dari timbulnya suatu penyakit. Perubahan tadi mungkin berupa kausa, proses atau akibat.

Insidens: frekuensi kejadian dari suatu peristiwa atau keadaan dalam kurun waktu atau periode tertentu dan berhubungan dengan populasi dimana kejadian tersebut berlangsung (Taber's Medical Dictionary, 1984)

Patobiologi: Adalah ilmu yang mempelajari perubahan biologik yang tidak lazim di dalam tubuh akibat interaksi individu dengan lingkungannya. Pada penelitian, perubahan yang terjadi disebabkan perlakuan (Rolla & Marino, 1980)

Psikoneuroimunologis, adalah perubahan yang merugikan atau menguntungkan sebagai pencerminan sistem yang mengalami stress, Sehingga menggambarkan perubahan respons imun terhadap stressor.

Pemeriksaan morfofungsi: Adalah pemeriksaan terhadap perubahan morfologi sel yang fungsional (Putra, 1997)

Pola diskriminan: Adalah contoh atau suatu model yang terbentuk dari gabungan variabel-variabel penciri sebagai hasil analisis fungsi diskriminan dan yang dapat dipergunakan sebagai kriteria pengelompokan untuk membedakan suatu populasi dengan populasi lainnya (Gaspersz V, 1992: Manly BF, 1986)

Pola variabel daerah parakorteks kelenjar getah bening: Adalah contoh atau suatu model yang terbentuk dari gabungan variabel-variabel penciri sebagai hasil analisis fungsi diskriminan dari variabel yang diukur di daerah parakorteks KGB, sehingga dapat dipergunakan sebagai kriteria pengelompokan untuk membedakan suatu populasi dengan populasi lainnya di daerah parakorteks KGB.

Prevalensi: Jumlah kasus dari suatu penyakit yang terdapat pada populasi tertentu dan dalam kurun waktu tertentu

Simplisia, adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain. Simplisia merupakan bahan yang dikeringkan.

Th tipe-1 atau type-1 pattern yaitu sel-sel yang memproduksi jenis sitokin mirip dengan sitokin yang dihasilkan Th1 terutama IFN- γ .

Th tipe-2 atau type-2 pattern yaitu sel-sel yang memproduksi jenis sitokin mirip dengan sitokin yang dihasilkan Th2 terutama IL-4

Th tipe-3 atau type-3 pattern yaitu sel-sel yang memproduksi beberapa sitokin terutama TGF (transforming growth factor)

Tc tipe-1 atau type-1 pattern yaitu subset Tc yang memproduksi jenis sitokin, mirip dengan sitokin yang dihasilkan Th1 terutama IFN- γ .

Tc tipe-2 atau type-2 pattern yaitu subset Tc yang memproduksi jenis sitokin mirip dengan sitokin yang dihasilkan Th2 terutama IL-4

Tc tipe-3 atau type-3 pattern yaitu subset Tc yang memproduksi terutama TGF (trans forming growth factor)

Variabel penciri: Adalah variabel yang dapat dipergunakan sebagai pembeda suatu populasi dengan populasi lainnya yang diperoleh dari perkalian nilai rerata suatu variabel dengan koefisien Fischernya. Variabel penciri ini diperoleh dari analisis diskriminan, setelah terlebih dahulu terbukti bahwa kedua set harga rerata dari 2 kelompok / populasi berbeda (Gaspersz V, 1992).

Waktu retensi: waktu yang diperlukan oleh suatu komponen / zat kimia untuk berjalan diantara fasa diam dan fasa bergerak mulai dari saat inyeksi sampai terdeteksi. Pada kondisi tetap, maka waktu retensi untuk setiap komponen sama (Sudarmadji S, 1996).

DAFTAR SINGKATAN

AM: alveolar macrophage

APC: antigen processing cell

APC: antigen presenting cell

BB: berat badan

CD: cluster of defferentiation

CD: cluster of designation

CD4+T: lymphocyte-T helper

CD8+T: lymphocyte-T cytotoxic

CMI : cell-mediated immunity

CTL: cytotoxic T lymphocyte (bentuk aktif dari limfosit Tc atau CD8⁺T)

CR: complement receptor

DTH : delayed type hypersensitivity

Da : Dalton

DAB : 3,3' diamino benzidine

kDa : kilo Dalton = 1000 Dalton

EMCA: ekstrak metanol *Centella asiatica*

FTECA: fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica*

HPLC: high performance liquid chromatography disebut juga high pressure
liquid chromatography

IFN- γ : interferon gamma

IL: interleukin

KGB: kelenjar getah bening

MHC - I: major histocompatibility complex kelas 1

MHC - II: major histocompatibility complex kelas 2

MØ: macrophage

M.tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

QS: *Quillaja saponaria*

Sel NK: sel natural killer

SPSS : Statistical Package for Social Sciences

TB: tuberkulosis

Tc: lymphocyte-T cytotoxic

Tc1: lymphocyte-T cytotoxic type 1

Tc2: lymphocyte-T cytotoxic type 2

TcR: lymphocyte-T cell receptor

TGF: transforming growth factor

Th: lymphocyte -T helper

Th1: lymphocyte-T helper type 1

Th2: lymphocyte-T helper type 2

TNF: tumor necrosis factor

slg: surface immunoglobulin

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 s/d Lampiran 3A-3B: Data penelitian	132
Lampiran 4 s/d Lampiran 9: Analisis statistik	179
Lampiran 10A s/d Lampiran 10D: Grafik hasil analisis statistik	189
Lampiran 10E: Hasil pemeriksaan HPLC	195
Lampiran 11 : Grafik rerata dan pola dari grup EMCA dan grup FTECA daerah parakorteks	196
Lampiran 12 : Persiapan bahan penelitian EMCA	197
Lampiran 13 : Persiapan reagen kimia dan peralatan	198
Lampiran 14 : Teknik pembuatan obyek gelas	199
Lampiran 15 : Teknik pewarnaan imunohistokimia dan Penilaian hasil pewarnaan	199
Lampiran 16 : Teknik pembacaan sediaan	201

BAB 1

Bab I**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Permasalahan****1.1.1 Prevalensi penyakit tuberkulosis paru**

Tuberkulosis paru merupakan penyakit infeksi, yang masih banyak dijumpai di negara sedang berkembang, keadaan ini dipengaruhi oleh tingkat pendidikan dan sosioekonomi yang rendah (WHO, 1993).

WHO, 1993 memperkirakan jumlah penduduk dunia yang terinfeksi *M.tuberculosis* berdasarkan tes tuberkulin positif adalah sekitar 1700 juta jiwa per tahun dengan penambahan sekitar 4 juta penderita baru dengan BTA (bakteri tahan asam) positif dan 4 juta penderita baru dengan BTA negatif. Menurut WHO, 1993 prevalensi tuberkulosis paru di dunia pada saat ini sebesar 20 juta orang dan kematian yang disebabkan sekitar 3 juta orang (Raviglione, 1995). Angka ini kira-kira 25% dari semua kematian di dunia, yang seharusnya dapat dicegah (WHO, 1993; Enarson, 1994).

Pada saat ini di Indonesia diperkirakan ada 500.000 kasus tuberkulosis paru dengan BTA atau bakteri tahan asam positif dan jumlah ini sama dengan 0,6% prevalensi tuberkulosis paru (Abdul Manaf, 1995)

Prevalensi terakhir berdasarkan survei yang dilakukan Dep.Kes. RI dengan koordinator Benyamin Margono dkk 1996 untuk wilayah Jawa Timur masih cukup tinggi, lebih kurang 14% (Margono, 1999). Untuk menurunkan prevalensi tuberkulosis paru, salah satu pendekatan yang belum pernah

dicoba adalah membangkitkan respons imun *host* dengan memakai obat yang berasal dari tanaman berkhasiat obat.

1.1.2 Imunomodulator ajuvan

Hasil penelitian Tenni 1988, menunjukkan bahwa ada tiga komponen *Centella asiatica* yang merupakan senyawa kimia aktif, yaitu asiaticoside, asiatic acid dan madecassic acid termasuk golongan triterpenoid saponin yang dapat meningkatkan aktivitas biosintesis fibroblas untuk menghasilkan serabut kolagen (Tenni,1988) . Penemuan ini telah dipergunakan sebagai obat untuk mempercepat penyembuhan luka baru (Maquart,1989).

Triterpenoid saponin dari tanaman *Quillaja saponaria* fraksi 7 dan 21 atau Qs-7 dan Qs-21 dapat meningkatkan ekspresi MHC kelas I makrofag serta meningkatkan aktivitas CD8⁺T menjadi sel efektor CTL (Newman, 1992; Kensil, 1996). Ekstrak *Quillaja saponaria* fraksi Qs-7 dan Qs-21 ternyata mampu melawan infeksi HIV-1IIIB melalui peningkatan aktivitas sitotoksik limfosit -T atau sel efektor CTL (Kensil, 1998a).

Dari hasil kedua penelitian di atas menunjukkan bahwa triterpenoid saponin, merupakan senyawa kimia yang dapat mempengaruhi aktivitas biologis hewan coba melalui kemampuan fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* atau FTECA memicu fibroblas untuk meningkatkan biosintesis kolagen dan melalui kemampuan Qs-7 dan Qs-21 untuk meningkatkan aktivitas limfosit CD8⁺T. Kemampuan ini dinamakan imunomodulator ajuvan.

Pada penelitian ini, peneliti ingin membuktikan bahwa komponen aktif *Centella asiatica* yang diperoleh melalui ekstraksi metanol, juga mempunyai kemampuan membangkitkan aktivitas biologis hewan coba, terutama efek biologis yang membangkitkan respons imun. Ada 2 kemungkinan yang dapat terjadi apabila EMCA dipergunakan untuk membangkitkan respons imun, pertama jika komponen aktif EMCA mengandung triterpenoid saponin dalam jumlah cukup banyak, sedangkan komponen aktif lainnya hanya sedikit maka larutan EMCA akan membangkitkan respons imun tikus melalui jalur endogen yaitu dengan meningkatkan aktivitas limfosit CD8⁺T, seperti yang dilakukan FTECA dan fraksi QS-7 atau QS-21 dari *Quillaja saponaria*.

Kedua jika EMCA mengandung triterpenoid saponin dalam jumlah kecil, tetapi komponen aktif lainnya dalam jumlah besar maka peningkatan respons imun akan didominasi oleh aktivitas CD4⁺T dan makrofag (M \emptyset) melalui jalur eksogen, yaitu mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan interleukin. Interleukin-1 (IL-1) dan interleukin-12 (IL-12) yang disekresi M \emptyset akan memicu limfosit CD4⁺ T menjadi aktif. Dengan demikian EMCA mempunyai 2 cara untuk membangkitkan respons imun tikus, yaitu melalui jalur endogen dan / atau jalur eksogen.

Larutan FTECA mengandung tiga komponen yang masing-masing mempunyai berat molekul kurang lebih 500 Dalton (Shukla, 1999). Berat molekul sekecil ini tidak dapat disebut antigen, tetapi hanya merupakan hapten. Penggabungan hapten dengan molekul protein di dalam sitosol mak-

rofag akan membentuk suatu kompleks molekul yang mampu bertindak sebagai imunogen untuk meningkatkan respons imun host dan komponen FTECA ini disebut ajuvan atau imunoajuvan (Playfair, 1992).

Ekstrak metanol *Centella asiatica* atau EMCA diperoleh melalui ekstraksi serbuk tanaman *Centella asiatica* dengan menggunakan metanol sebagai ekstraktor. Metanol suatu ekstraktor sederhana yang sering dipergunakan untuk mengekstraksi lipid dari tanaman atau herba selain dari chloroform (Harborne, 1973). Triterpenoid saponin merupakan senyawa lipid yang terdapat di dalam tanaman *Centella asiatica* (Robinson,1991) dan melalui teknik ekstraksi ini diharapkan akan diperoleh komponen aktif yang hampir sama, apabila pegagan atau *Centella asiatica* dimakan langsung seperti yang dilakukan masyarakat awam.

Perlu diketahui bahwa, tanaman berkhasiat obat sampai sekarang masih merupakan sumber obat kedua yaitu 11,1 % setelah obat sintesis kimia 48,9 % (Siswandono,1995). Kenyataan ini menunjukkan bahwa peluang untuk mencari obat yang berasal dari tanaman berkhasiat obat masih terbuka lebar.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah paparan dengan larutan ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA) yang diberikan per oral dapat meningkatkan respons imun di

daerah parakorteks kelenjar getah bening (KGB) mesenterium tikus, yang lebih besar bila dibandingkan dengan hasil paparan larutan garam faali sebagai kontrol plasebo ?.

2. Apakah paparan dengan larutan kontrol fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* (FTECA) yang diberikan per oral dapat meningkatkan respons imun di daerah parakorteks kelenjar getah bening (KGB) mesenterium tikus, yang lebih besar bila dibandingkan dengan paparan larutan garam faali sebagai kontrol plasebo ?.
3. Apakah besar dosis perlakuan EMCA yang diberikan yaitu: 187,50 μg ; 375,0 μg ; dan 750 μg per 100 gram berat badan tikus ikut mempengaruhi modulasi respons imun ?.
4. Apakah paparan larutan EMCA pada KGB tikus dalam dosis yang berbeda menimbulkan pola variabel respons imun yang berbeda ?.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mengungkapkan mekanisme yang dipergunakan larutan EMCA dan larutan kontrol positif FTECA dalam meningkatkan respons imun di daerah parakorteks kelenjar getah bening tikus.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan bahwa peningkatan respons imun karena terpapar larutan EMCA lebih besar bila dibandingkan dengan peningkatan respons imun karena terpapar larutan plasebo. Dibuktikan dengan mengukur besarnya perubahan variabel $CD4^{+}T$, $CD8^{+}T$, makrofag, $IFN-\gamma$ dan $slgA$, $slgG$, $slgM$
2. Membuktikan bahwa peningkatan respons imun karena terpapar larutan FTECA lebih besar bila dibandingkan dengan peningkatan respons imun karena terpapar larutan plasebo. Dibuktikan dengan mengukur besarnya perubahan variabel $CD4^{+}T$, $CD8^{+}T$, makrofag, $IFN-\gamma$ dan $slgA$, $slgG$, $slgM$
3. Membuktikan bahwa besarnya peningkatan respons imun ada hubungannya dengan dosis EMCA yang diberikan, yaitu 187,50 μg ; 375,0 μg ; dan 750 μg per 100 gram berat badan tikus. Dibuktikan dengan mengukur besarnya perubahan variabel $CD4^{+}T$, $CD8^{+}T$, makrofag, $IFN-\gamma$ dan $slgA$, $slgG$, $slgM$.
4. Membuktikan bahwa paparan EMCA dengan dosis 187,50 μg ; 375,0 μg ; dan 750 μg per 100 gram berat badan tikus mempengaruhi pola respons imun.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian dapat mengungkap mekanisme yang menyebabkan perubahan respons imun karena terpapar larutan EMCA dan larutan FTECA yang diberi per oral.
 2. Hasil penelitian ini dapat dipergunakan sebagai obat suportif untuk meningkatkan daya tahan tubuh untuk melawan infeksi intraseluler maupun infeksi ekstraseluler..
 3. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menunjang program pemerintah untuk memanfaatkan tanaman berkhasiat obat yang banyak tumbuh di Indonesia.
 4. Hasil penelitian dapat menjadi pegangan untuk pengembangan manfaat serta budidaya *Centella asiatica* lebih lanjut dalam rangka memenuhi kebutuhan obat untuk masyarakat.
-

BAB 2

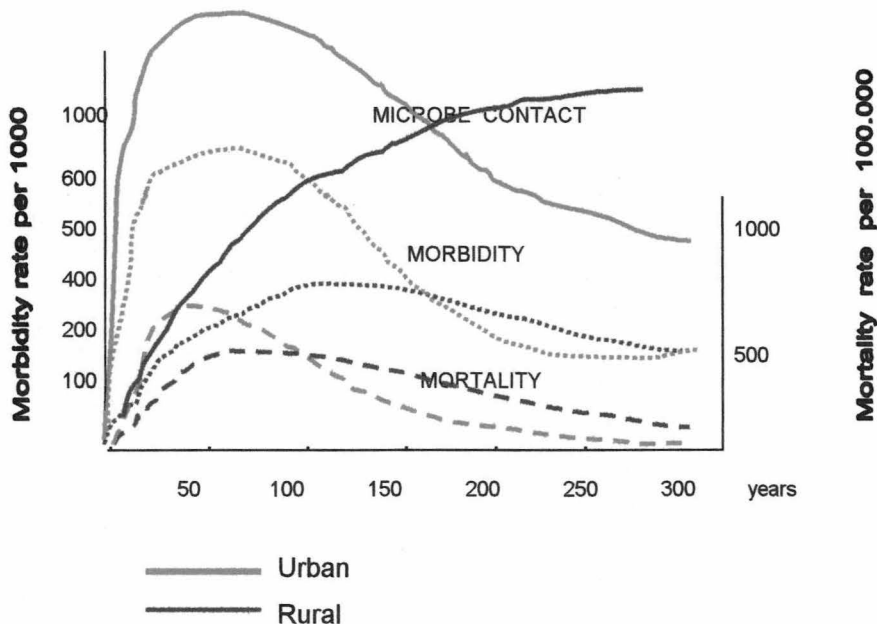
Bab 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Resistensi Host-Parasit, Parasit-Antibiotik

2.1.1 Resistensi host terhadap parasit

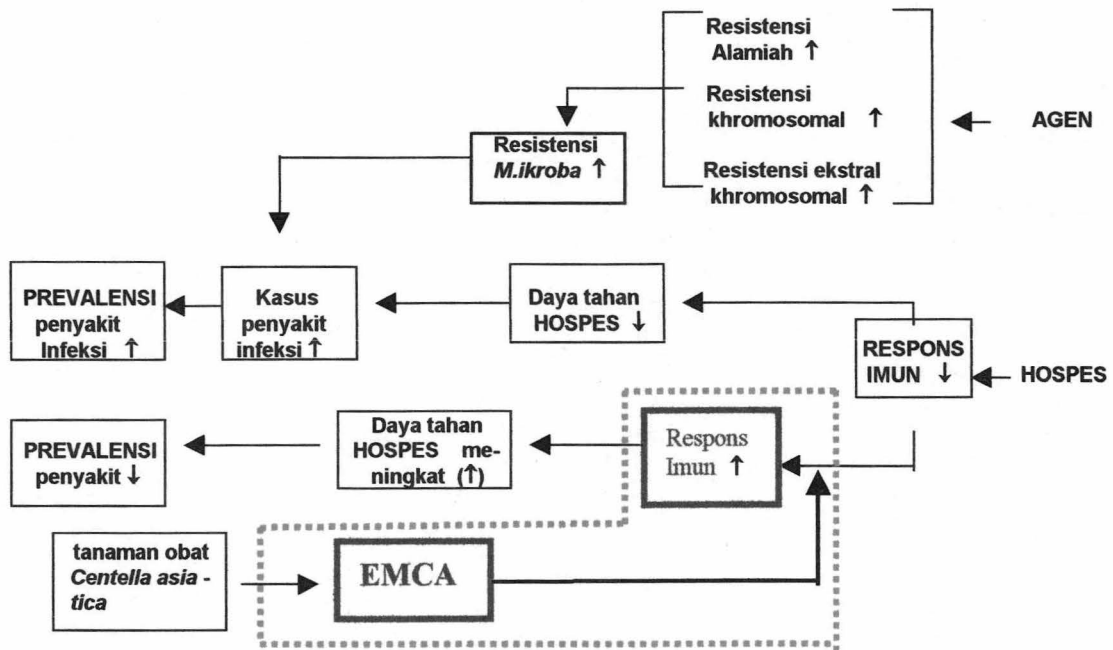
Pola epidemi dari hampir semua penyakit mempunyai bentuk kurva yang sama, yaitu fase permulaan diawali oleh penyebaran penyakit secara perlahan-lahan, diikuti penyebaran penyakit lebih cepat hingga mencapai puncak. Selanjutnya penyebaran penyakit mulai menurun sampai tercapai kestabilan, dan pada saat itu penyakit tidak lagi merupakan suatu epidemi, tetapi hanya merupakan suatu penyakit endemi biasa (Stead, 1994)



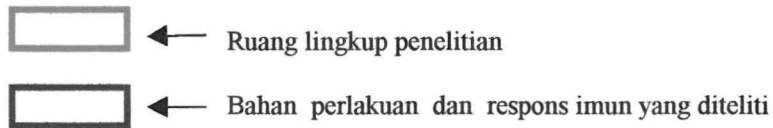
Gambar 2.1 Grafik yang menjelaskan secara teori morbiditas dan mortalitas suatu penyakit pada suatu populasi (dikutip dari *Tuberculosis* by Schlossberg, 1994)

Kurva seperti gambar 2.1 di atas tidak ada perbedaan untuk infeksi akut maupun infeksi khronis. Perbedaan hanya pada lamanya waktu yang diperlukan untuk terjadinya kurva sesuai dengan perjalanan penyakit. Sebagai contoh, epidemi tuberkulosis mencapai puncak setelah penyebaran tuberkulosis berjalan 50 - 75 tahun, kemudian menurun dengan kecepatan 1% hingga 2% per tahun dengan titik terendah penyebaran setelah berjalan 300 tahun. Peristiwa ini menunjukkan adanya proses adaptasi host terhadap patogen secara alamiah, sehingga host akhirnya menjadi lebih resisten terhadap patogen. (Schlossberg,1994).

2.1.2 Resistensi mikroba terhadap antibiotik



Skema 2.1 Alur yang menjelaskan hubungan latar belakang masalah dengan kemungkinan pemecahannya.



Skema 2.1 di atas, menunjukkan bahwa banyak faktor yang berperan pada peningkatan / penurunan prevalensi suatu penyakit, dalam kaitannya dengan peningkatan / penurunan respons imun. Karena itu penelitian ini membatasi diri hanya pada peningkatan respons imun yang terdapat di daerah parakorteks kelenjar getah bening setelah terpapar dengan EMCA.

Prevalensi suatu penyakit dapat meningkat secara alamiah dengan timbulnya satu mutan untuk jumlah tertentu mikroba. Pada penyakit tuberkulosis, satu mutan akan timbul untuk setiap $10^7 - 10^{12}$ *M.tuberculosis* (Youmans, 1979). Mutasi ini merupakan proses alamiah karena pemakaian obat yang tidak teratur / tidak adekuat atau karena mutasi spontan dari gen yang mengatur reseptor mikroba terhadap kelompok antibiotik tertentu (Wattimena, 1991). Karena itu kecepatan timbulnya resistensi mikroba terhadap setiap jenis antibiotika tidak sama. Sebagai contoh antibiotika golongan aminoglikosida, mikrolida dan rifampisin termasuk kelompok antibiotika yang cepat mengalami resistensi, sedangkan golongan penisilin, basitrasin dan golongan sefalosporin merupakan kelompok yang lambat mengalami resistensi (Wattimena, 1991).

2.2 Tanaman Berkhasiat Obat

Di Indonesia terdapat kurang-lebih 30.000 jenis tumbuhan, banyak di antaranya mempunyai potensi sebagai tanaman obat. Karena itu sudah saatnya penelitian dasar, yang dilakukan selama ini dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat diperoleh manfaat bagi bidang kesehatan dan pengobatan bahkan dapat diarahkan menjadi tujuan ekspor (Sutarjadi, 1994).

Tanaman berkhasiat obat dalam kehidupan sehari-hari masih sangat terbatas pemakaiannya, karena belum dimanfaatkan secara luas. Sedangkan khasiat utama obat yang berasal dari tanaman secara tradisional adalah untuk menghilangkan keluhan serta gejala suatu penyakit dan bukan untuk menghilangkan penyebabnya dan sebagian besar mekanisme kerjanya belum diketahui dengan jelas (Sutarjadi, 1994).

2.2.1 Tanaman berkhasiat obat *Centella asiatica*



Gambar 2.2 *Centella asiatica* (Linn) Urban (dikutip dari Warta Tumbuhan obat Indonesia, 1992)

Centella asiatica (Linn) Urban, merupakan tanaman dari divisi spermatophyta, anak divisi angiospermae, kelas dicotyledoneae, anak kelas dialypetalae, bangsa umbelliferae (Apiales), suku (familia) umbellifloreae (Apiaceae), marga (genus) centella atau hydrocotyle, jenis (species) *Centella asiatica* (Linn) Urban atau *Hydrocotyle asiatica* (Linn) Urban (Lawrence , 1981; Tjitrosoepomo, 1994)



2.2.1.1 Nama daerah

Sumatra: pegaga (Aceh); daun kaki kuda, daun pegaga, rumput kaki kuda, pegagan, kaki kuda (Melayu); pegago, pugago (Minangkabau); Jawa: Cowet gompeng, antanan, antanan bener, antanan gede (Sunda); gagan-gagan, ganggagan, kerok batok, panegowang, panigowang, rendend, cilingan (Jawa); gan gagan (Madura); Nusa Tenggara: bebele (Sasak); paiduh, panggaga (Bali), Sulawesi pagaga, wisu-wisu(Makasar), cipubalawo (Bugis), hisu-hisu (Salayar) dan Irian: dogauke, gogauke, sandanan.

(Dep.Kes RI, 1981)

2.2.1.2 Simplisia herba *Centella asiatica*

Centella asiatica (Linn) Urban atau pegagan atau daun kaki kuda merupakan tanaman berkhasiat obat dengan kandungan kimia terdiri dari kelompok terpenoid. Dinamakan triterpenoid karena struktur kimianya merupakan polimer dari *isoprene* dengan 30 atom karbon. Senyawa kimia

yang dikandung tanaman ini berbeda satu dengan lain. Perbedaan ini dipengaruhi oleh variasi daerah, variasi tanaman serta lokalisasi tumbuhnya tanaman (Peterkofsky, 1971; Perry, 1980). Sebagai contoh, *asiaticoside* dengan formula $C_{48}H_{78}O_{19}$, dan *asiatic acid* dengan formula $C_{30}H_{48}O_5$, berikatan dengan glukosa dan rhamnosa merupakan zat aktif *Centella asiatica* berasal dari Madagaskar, sedangkan yang tumbuh di Sri Lanka mengandung tiga asam triterpen yaitu *centoic acid* ($C_{30}H_{48}O_6$), *celtellic acid* ($C_{30}H_{48}O_6$) dan, *centic acid* ($C_{30}H_{48}O_5$), dimana *centoic acid* dan *celtellic acid* merupakan isomer (Watt, 1962). Selain *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid*, isolat *Centella asiatica* yang berasal dari India, adalah asam sentolat ($C_{30}H_{48}O_6$), asam sentelat ($C_{30}H_{46}O_6$) (Widowati, 1992), dan brahmasida, thunkunisida, alkaloida hidrokotilina ($C_{22}H_{33}NO_8$) dan saponin (Talalaj, 1989). Polansky memperoleh *asiaticoside* ($C_{48}H_{78}O_{19}$) dan *asiatic acid* ($C_{30}H_{48}O_5$) dari tanaman yang tumbuh di Madagaskar. Senyawa kimia mirip steroid yang di kandung triterpenoid saponin adalah *asiaticoside*, *asiatoside*, *asiatic acid*, *madecassic acid*, *madicassoside*. Bentuk lain triterpenoid adalah *oxyasiaticoside*, *brahminoside*, *brahmoside* dan *centelloside*. Senyawa kimia dalam bentuk asam bebas adalah *asiatic acid*, *brahmic acid*, *centellinic acid*, *isobrahmic acid*, *madecassic acid* dan *betulic acid*. Senyawa kimia dalam bentuk minyak atsiri adalah *vallerin*, *camphor*, *cineole*. Senyawa kimia dalam bentuk gliserida adalah *campesterol*, *stigmasterol* dan *sitosterol* dan senyawa kimia dalam bentuk flavonoid adalah *kaempferol* dan *quercetin* serta alkaloid

hydrocotyline, myoinositol, amino acid, resin, tannin (Ozarko,1995). *Asiaticoside* yang diproduksi oleh Apin Chemical Ltd (United Kingdom) mempunyai formula $C_{48}H_{78}O_{19}$, sedangkan La Roche Navarron Laboratories di Perancis memproduksi *asiaticoside acid* dan *madecassic acid* yang merupakan derivat dari *asiatic acid* (Madecassol, 1990). Berat molekul *asiaticoside* 488,70 Da; berat molekul *asiatic acid* 488,70 Da dan berat molekul *madecassic acid* 504,70 Da (Wagner,1984; Shukla,1999)

Pada tumbuhan tingkat tinggi, sampai saat ini telah dapat diidentifikasi 3 kelompok senyawa kimia yang mempunyai berat molekul rendah maupun berat molekul tinggi, yang mampu mempengaruhi sistem imun karena bersifat immunostimulator. Ketiga kelompok senyawa kimia tersebut, adalah:

- a. Pertama, senyawa alkaloid dan senyawa nitrogen yang mempunyai aktivitas immunologik, seperti *aristolochic acid* dari tanaman *Aristolochia clemetis*, senyawa kimia cepharanthineform dari tanaman *Stephania cephaanthadan tylophorine* dari tanaman *Tylophora indica* (Hoffman,1996)
- b. Kedua, *senyawa terpene* dari hlenalin, tenulin, eupahyssopin semuanya merupakan immunostimulan dan senyawa *sesquiterpene*. Diduga senyawa *sesquiterpene* mempunyai efek sama. Di jepang sejumlah besar saponin yang berasal dari triterpen telah dipergunakan sebagai ekstrak kimia yang berasal dari tanaman dan terbukti suatu imunoajuvan (Hoffman, 1996).

Saponin dari kulit batang tanaman *Quillaja saponaria* dapat meningkatkan aktivitas limfosit CD8⁺T (Kensil, 1991; Harding, 1997).

- c. Ketiga *Phenol* yang merupakan sumber molekul aromatik telah diketahui mempunyai efek imunologik, *asafretida* berasal dari *Ferula foetida* meningkatkan aktivitas fagosit pada mencit; minyak anis atau anetol atau *anetholum (aniseed oil)* meningkatkan jumlah leukosit pada darah tepi dan *pseudo-tannin catechol* memicu pertumbuhan granulosit. Lignan kompleks terbukti merangsang aktivitas fagosit dari PMN granulosit, sitotoksitas serta menginduksi interferon (Male, 1994; Hoffman, 1996) Senyawa kimia yang mempunyai berat molekul tinggi dan bersifat imunostimulan adalah *lectin* dan polisakarida. *Lectin* banyak dihasilkan *Phytolaccadecandra* dan *Viscum album* (Hoffman, 1996). FTECA adalah kelompok triterpenoid termasuk dalam golongan terpene (Tenni, 1988; Maquart, 1990). Karena EMCA berasal dari tanaman yang sama yaitu *Centella asiatica*, maka dapat diasumsikan EMCA juga suatu komponen dari kelompok triterpenoid. Dengan demikian juga mempunyai sifat stimulan.

2.2.2 Fraksi terstandar ekstrak *centella asiatica* (FTECA)

FTECA adalah campuran tiga komponen zat yang berasal dari *Centella asiatica* yaitu *asiaticoside* 40% (4 mg), *asiatic acid* 30% (3 mg) dan *madecassic acid* 30% (3 mg) di dalam tablet dengan berat rerata 200 mg per tablet (Tenni, 1988). Dari ketiga komponen tersebut *asiatic acid* dan

asiaticoside yang paling aktif meningkatkan sintesis kolagen matriks sehingga dapat mempercepat penyembuhan luka. *Asiaticoside* bekerja sebagai stimulan, bila diberikan dalam dosis rendah. *Asiatic acid* lebih aktif dibandingkan *asiaticoside* pada percobaan *in vivo*, karena *asiaticoside* merupakan *pro-drug* untuk *asiatic acid* (Maquart, 1999).

2.2.3 Ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA)

Merupakan campuran seluruh komponen / senyawa kimia yang dapat dihasilkan dari ekstraksi tanaman *Centella asiatica* dengan menggunakan metanol sebagai bahan ekstraktor (Taib, 1999).

2.3 Triterpenoid Saponin

Terpenoid, merupakan istilah yang mencakup sejumlah besar senyawa tumbuhan dan dikelompokkan berdasarkan persamaan biosintesis, yang berasal dari molekul *isoprene* { $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3) - \text{CH} = \text{CH}_2$ }. Terpenoid terdiri dari beberapa macam senyawa, mulai dari minyak atsiri, yaitu *monoterpene* dan *sesquiterpene* yang mudah menguap (C_{10} dan C_{15}), *diterpene* lebih sukar menguap (C_{20}), senyawa yang sukar menguap *triterpene* dan *sterol* (C_{30}) serta pigmen *carotenoid* (C_{40}) (Harborne, 1983; Robinson, 1991). Walaupun dikatakan *triterpene* merupakan turunan dari *isoprene* secara biosintesis, tetapi prazat yang sebenarnya adalah *isopentenil pirofosfat*

$\{CH_2=C(CH_3)CH_2CH_2OPP\}$ yang terbentuk dari asam asetat melalui asam *mevalonat* $\{CH_2OHCH_2C(OHCH_3)CH_2COOH\}$ (Robinson, 1991).

2.4 Khasiat Triterpenoid Saponin dari Beberapa Tanaman Obat

Triterpenoid saponin suatu glikosida dari larutan berbuih saponin sedangkan bentuk aglikonnya adalah *sapogenin*. Saponin menyebabkan presipitasi kolesterol bila dilarutkan dalam alkohol dan menyebabkan hemolisis eritrosit untuk hewan yang bernafas dengan insang. Saponin suatu zat organik yang mempunyai berat molekul cukup besar dengan polaritas tinggi sehingga sukar diperoleh dalam bentuk murni (Wagner, 1984). Saponin dapat diklasifikasikan dalam 2 kelompok yaitu *steroid* dan *triterpenoid* dengan struktur linier atau siklik. Saponin yang berasal dari tanaman banyak dipergunakan sebagai obat-obatan seperti, ekspektoran, antitusif, tonikum, diuretik. Di samping itu saponin diduga mempunyai aktivitas biologik (Evans, 1976; Wagner, 1984). Glukosa, rhamnosa yaitu residu gula yang terikat pada triterpenoid saponin dapat memasuki sitosol makrofag dengan bantuan liposom. Liposom adalah salah satu dari 3 bentuk lipid bila berada dalam suatu larutan, terutama yang bersifat hidrofobik. Bentuk liposomal dapat melindungi obat atau zat lain terhadap enzim perusak pada saat memasuki sitosol makrofag dan mempunyai sifat antimikrobia untuk melawan infeksi, antara lain infeksi *M.tuberculosis* dan *M.leprae* (Medda, 1995). Di bawah ini dijelaskan beberapa aktivitas triterpenoid saponin:

2.4.1 Hepatoprotektor

Tiga dari sepuluh jenis senyawa organik yang termasuk dalam kelompok *triterpenoid*, yaitu *alpha-hederin*, *ursolic acid* dan *olenic acid* ternyata efektif mencegah timbulnya kerusakan hati yang disebabkan oleh CCl_4 , *acetaminophen* dan *cadmium chloride* (Liu, 1994).

2.4.2 Antikonvulsi dan mempunyai efek sedatif

Triterpenoid galphimine B merupakan senyawa organik *nor-secotriterpenoid* yang diperoleh dari isolasi *Galphimia glauca* merupakan obat tradisional Meksiko yang mempunyai aktivitas depresan kuat (Soerahso, 1992; Ozarko, 1995).

2.4.3 Obat cacing

Pada percobaan untuk melihat pengaruh triterpenoid saponin dari tanaman *Acacia auriculiformis* terhadap cacing yang hidup di dalam usus dengan menggunakan mencit dan tikus yang dilakukan Ghosh, 1993, ternyata dua jenis isolat *triterpenoid saponin* yang diperoleh dari tanaman *Acacia auriculiformis* dapat membunuh larva cacing *Microfilaria cervi* tanpa memberi efek samping yang berbahaya bagi hospes (Ghosh, 1993).

2.4.4 Aktivitas antivirus

Hederagenin atau aglikon isolat *foleanolic acid* yaitu dari *Dermato-*

tophyte species mempunyai aktivitas *anti-viral* (Favel, 1994; Perry, 1994).

Aktivitas antivirus terjadi karena gabungan aktivitas IFN- γ dengan IL-2. IFN- γ terutama disekresi oleh limfosit CD8⁺T dan sebagian kecil oleh limfosit CD4⁺T (Th1) merangsang reseptor (IL-2R) sel NK dan CD8⁺T menjadi aktif sehingga IL-2 yang disekresi Th-1 dapat berinteraksi dengan lebih kuat untuk mengaktifkan dan merubah sel NK dan CD8⁺T menjadi sel efektor (Williams, 1993; Halloran, 1993; Oppenheim, 1997).

2.4.5 Menghambat proliferasi sel (*tumor cell line*)

Alpha-hederin suatu triterpenoid saponin dari *Hedera helix*, mampu menghambat proliferasi *mouse B16 melanoma cells* dan *non-cancer mouse 313 fibroblast cell* (Danloy, 1994).

2.4.6 Menurunkan tegangan permukaan

Triterpenoid yang banyak terdapat pada kulit batang serta akar pohon bakau atau *mangrove* yang tumbuh di tepi pantai ternyata merupakan racun ikan kuat, bekerja dengan cara menurunkan tegangan permukaan sel darah merah (Heyne, 1987).

2.4.7 Aktivitas imunomodulasi

Glikosida tetrasiklik *triterpene holostan* (*holoturins A dan B, holoturin A2 dan holotoxin A1*) dan glikosida *triterpene* dari *dammiran* pada pene-

litian *in vitro* dengan menggunakan kultur limfosit-B, bila diberikan dalam konsentrasi rendah menunjukkan aktivitas mitogenik serta memodulasi respons imun (Popov, 1994).

2.4.8 Triterpenoid saponin sebagai ajuvan

Triterpenoid saponin dari tanaman *Quillaja saponaria* bekerja sebagai ajuvan yang memicu makrofag mengekspresikan MHC kelas I serta meningkatkan aktivitas limfosit CD8⁺T (Tc) untuk berdiferensiasi menjadi CTL, yaitu bentuk aktif dari CD8⁺T (Harding, 1991; Newman, 1994; Kensil, 1996)

Masihi, 1999 mengklasifikasi imunostimulans ke dalam 5 kategori, pertama yang berasal dari seluruh mikroba yaitu strain mikroba yang diperkuat dan *heat-killed microbe*, kedua berasal dari hasil produk mikroba yaitu isolat fraksi mikroba, ketiga senyawa yang berasal dari alam seperti fraksi dari tanaman dan hormon yang diperoleh dari timus, keempat senyawa sintetik seperti *isoprinosine* dan muramil peptida dan kelima senyawa yang berasal dari dalam tubuh host sendiri yaitu sitokin antara lain IFN- γ , interleukin (IL) dan CSF (Masihi, 1999).

Purple coneflower dari spesies *Echinacea* mampu membangkitkan aktivitas fagositosis neutrofil pada percobaan *in vivo* maupun *in vitro*. Akar ginseng Siberia (*Eleutherococcus senticosus*) merupakan tonik dan mampu membangkitkan respons imun (Parnham, 1999).

Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa FTECA mampu meningkatkan biosintesis jaringan kolagen (Tenni, 1988). Komponen aktif yang terdapat pada EMCA dan FTECA adalah triterpenoid saponin (Heyne, 1987). Sedangkan saponin merupakan deterjen yang mampu berdifusi ke dalam sitosol untuk membentuk liposom atau sintetik lipid vesikel (Playfair, 1992). Karena itu perlu dibuktikan apakah EMCA juga mempunyai fungsi sebagai imunostimulator dan bekerja sebagai stimulan ajuvan.

2.5 Khasiat Triterpenoid Saponin *Centella asiatica*

2.5.1 Mempercepat penyembuhan luka

FTECA mampu mempercepat penyembuhan luka serta memperbaiki metabolisme glukosa (Arpaia, 1990). Peptida hidroprolin yang dihasilkan karena rangsangan FTECA, mempercepat pembentukan matriks luka dan menyusun kembali bentuk kulit (Maquart, 1999). *Asiaticoside* dan *madecassic acid* merangsang sekresi kolagen tipe I sebesar 25-30%, sedangkan sekresi kolagen tipe III hanya dirangsang oleh *madecassic acid* (Bonte, 1995).

2.5.2 Mempengaruhi biosintesis kolagen

Fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* pada percobaan dengan sel-sel fibroblas yang berasal dari jaringan kulit manusia, ternyata dapat meningkatkan biosintesis serabut kolagen, jika ke dalam media kultur fibroblas

diberi FTECA dengan konsentrasi $\leq 25 \mu\text{g} / \text{ml}$, tetapi bila konsentrasi FTECA ditingkatkan menjadi $\geq 50 \mu\text{g} / \text{ml}$ akan menghambat biosintesis serabut kolagen (Vecchio, 1984; Tenni, 1988; Maquart, 1989). *Asiaticoside* dan *madecassic acid* meningkatkan sekresi kolagen tipe I dalam waktu 48 jam dan kolagen tipe II dalam waktu 72 jam (Bonte, 1995).

2.5.3 Antihipertensi

Percobaan dengan anjing teranestesi, ternyata ekstrak *Centella asiatica* dapat menurunkan tekanan darah. Kemungkinan karena pengaruh diuresis yang ditimbulkan *tanin* dan *flavonoida* (Pramono, 1992; Suwondo, 1992).

2.5.4 Diuretika

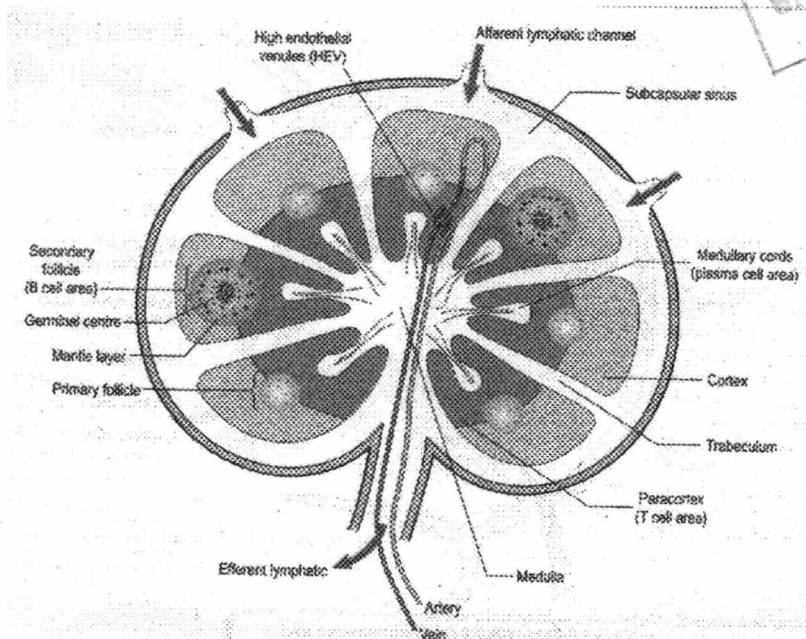
Tanin dan *flavonoida* yang mempunyai efek diuretika, dijumpai dalam jumlah cukup banyak di dalam ekstrak *Centella asiatica*. Percobaan pada infus daun pegagan, menunjukkan efek diuretika pada dosis 1,6 g per 100 g berat badan tikus (Nurhayati, 1980).

2.6 *Centella asiatica* Sebagai Obat Tradisional

Di Indonesia pegagan atau *Centella asiatica* dipergunakan sebagai campuran jamu untuk mengobati berbagai macam penyakit, seperti obat menambah nafsu makan, obat pelangsing tubuh, obat penurun panas, obat kesuburan bagi wanita, obat sukar tidur, obat sakit kepala, obat keracunan

jengkol, obat penyakit lepra dan tuberkulosis paru, obat batuk rejan, obat infeksi pada saluran kemih, (Soerahso, 1992; Materia Medika, 1993; Dinas Kesehatan Daerah, 1993). Di India, Sri Lanka, seperti yang tertulis di dalam buku pengobatan *ayurveda* (Angela, 1998), *Centella asiatica* atau *gotu kola* atau *Indian pennywort* merupakan obat tradisional untuk penyakit tuberkulosis paru dan penyakit lepra (Walter, 19 77; Angela, 1998).

2.7 Kelenjar Getah Bening (KGB)



Gambar 2.3 Struktur penampang kelenjar getah bening (dikutip dari *Basic and Clinical Immunology* oleh Pealman M, 1997)

Dari struktur penampang KGB di atas dapat dilihat bahwa aliran limfe masuk ke KGB melalui pembuluh aferen (panah merah) masuk menuju subkapsul dari sinus marginalis. Dari sini limfosit dan antigen masuk

subcapsular zone terus ke korteks dan menuju ke medula, selanjutnya melalui eferen menuju *ductus thoracicus*. Di *subcapsular zone* dapat terjadi aktivitas respons imun yang T-independen. Di korteks terdapat folikel primer yang berisi sel limfosit, makrofag dan sel dendritik dalam keadaan istirahat atau tidak aktif. Folikel primer akan berubah menjadi folikel sekunder, jika ada stimulasi terhadap limfosit-B yang berada di dalam senter jerminal folikel sekunder. Limfosit-B akan berproliferasi dan didiferensiasi menjadi limfoblas B. Di daerah parakorteks terutama terdapat limfosit T, dan *interdigitating dendritic cell* yaitu sejenis makrofag serta limfoblas B yang akan menuju medula. Di daerah parakorteks aktivasi sel imunokompeten yang menimbulkan respons imun melalui T-dependen (Peakman, 1997).

Pada gambar 2.3 tampak kelenjar getah bening (KGB) yang terdiri dari jaringan limforetikuler dan diperkuat oleh jaringan penyangga serta sel-sel bebas. Jaringan penyangga pada KGB merupakan anyaman serabut kolagen dan serabut retikulin sedangkan sel-sel bebas antara lain limfoid dan non-limfoid. Pada manusia KGB berbentuk oval dengan diameter lebih kurang 30 mm, bagian luar terdiri dari simpai padat yang membentuk beberapa ruang di dalam KGB. Setiap KGB terdapat 3 pembuluh eferen dan sekitar 8 pembuluh aferen yang menembus simpai dan mempunyai 2 katub. Pembuluh eferen meninggalkan KGB melalui hilus bersama-sama dengan masuknya arteri, vena dan serabut syaraf (Szakal, 1989; Ogra, 1994). Jaringan limfoid yang berfungsi sebagai sistem imun pada saluran pencernaan dapat dibagi atas

dua kelompok, pertama jaringan limfoid tidak berkapsul atau *Peyer's patch* yang merupakan pertahanan pertama terhadap patogen / antigen yang masuk melalui mulut. dan kedua kelenjar getah bening mesenterium berfungsi membantu *Peyer's patch*, bila fungsi eliminasi pertama tidak berjalan dengan sempurna. Bagian-bagian yang membentuk KGB adalah sebagai berikut:

1. Simpai dan trabekula

Simpai membungkus KGB tersusun dari serabut elastin tipis dengan beberapa bagian menjorok ke dalam membentuk sekat ke arah hilus dan bagian ini disebut trabekula dan simpai menebal bila terjadi peradangan

(Stansfeld, 1985; Szakal, 1989).

2. Folikel kelenjar getah bening

Folikel merupakan daerah berbentuk oval atau bulat di dalam KGB. Ada 2 bentuk folikel, folikel primer terlihat jelas terdiri dari kelompok limfosit kecil serta banyak dijumpai pada daerah korteks superfisial KGB yang tidak reaktif. Bila folikel primer mendapat rangsangan bersifat antigenik, maka folikel primer tampak pucat (disebabkan multiplikasi limfosit) dan disebut folikel sekunder atau jerminal senter. Jumlah limfosit bertambah banyak menyebabkan warna putih. Oleh Flemming pada tahun 1885, daerah ini disebut *germinal center* dan sebagai pusat kegiatan limfosit, karena itu disebut pula *reactive center* (Mac Lennan, 1994).

3. Parakorteks kelenjar getah bening

Parakorteks merupakan daerah limfosit-T secara morfologik tidak tampak jelas seperti folikel di korteks. Bila aktivitas parakorteks meningkat, *post capillary venules* (pcv) akan tampak lebih jelas dengan endotel membulat dan pada dinding pcv (diantara endotel) sering terlihat sel limfosit berasal dari sirkulasi darah perifer yang akan masuk ke jaringan KGB melalui interaksi antara *L-selectin homing receptor* (LFA-1) limfosit dengan CD34 dan *vascular addressin* endotel atau glyCAM-1 (Springer, 1994; Butcher, 1998; Janeway, 1999). Perpindahan limfosit dari aliran darah perifer ke KGB terutama terjadi di parakorteks dan sekaligus merupakan tempat limfosit-T. Kesimpulan ini didasarkan pada jumlah limfosit T yang banyak dijumpai di parakorteks, sedangkan di sirkulasi darah perifer jumlah limfosit-T lebih dominan dibandingkan dengan limfosit-B. Sedangkan *marginal zone* serta folikel merupakan tempat limfosit-B (Mac Lennan, 1994; Springer, 1994).

4. Sinus kelenjar getah bening

Sinus KGB berisi sel limfosit dan sel non-limfosit yang berasal dari pembuluh aferen, selanjutnya mengalir ke sinus korteks dan terus ke sinus medula. Dari medula cairan getah bening meninggalkan KGB melalui pembuluh eferen. Komposisi sinus serta ukuran sinus dipengaruhi oleh aktivitas KGB. Bila sinus melebar dan dipenuhi sel-sel histiosit, maka gambaran ini disebut *sinus histiocytosis* (Stansfeld, 1985; Mac Lennan 1994).

2.7.1 Sel limfoid

Kelenjar getah bening, secara morfologik dan fungsional dapat dibagi atas dua bagian yang mempunyai fungsi sedikit berbeda (Peakman, 1997a, Kuby, 1992b). Seperti yang juga dapat dilihat pada kelenjar getah bening mesenterium (KGB) yang dipergunakan pada penelitian ini, yaitu terdapat 2 kelompok sel yaitu sel-sel limfoid dan sel-sel non-limfoid yang selanjutnya akan diuraikan di bawah ini:

1. Limfosit kecil

Limfosit kecil merupakan istilah morfologik, karena terlihat kecil pada mikroskop, belum dapat dibedakan apakah limfosit-T atau limfosit-B. Sel limfosit ini berbentuk bulat atau oval dengan diameter 7-9 μm dan mempunyai sedikit sitoplasma. Intinya berbentuk bulat dengan khromatin kasar, menggumpal, tersebar dan anak inti tidak kelihatan jelas (Catovsky, 1976; Szakal, 1989). Di dalam darah perifer, limfosit terdapat 25-35% dengan perbandingan limfosit-T : limfosit-B = 5:1 (Peakman, 1997a). Proporsi sel-sel limfosit berbeda untuk berbagai jaringan. Di sirkulasi darah perifer limfosit-T 75%, limfosit-B 10% dan sisa 15% adalah sel NK (Tristram, 1997).

2. Limfosit-T

Limfosit-T berasal dari *pluripoten hematopoietic stem cell* (HSCs) sumsum tulang. Di dalam timus limfosit-T mengalami diferensiasi dan proliferasi.

Setelah keluar dari timus, limfosit-T dewasa memasuki aliran darah dari saluran getah bening menuju jaringan limfoid perifer (KGB dan limpa). Di KGB limfosit-T menempati daerah parakorteks dan selanjutnya berproliferasi membentuk limfosit-T generasi berikutnya yaitu beberapa subset limfosit-T penolong, limfosit supresor dan limfosit-T sitotoksik yang mempunyai fungsi ikut mengatur aktivitas sel-sel di dalam sistem imun. Di daerah perifer perbandingan limfosit-T penolong (Th) dan limfosit-T sitotoksik (Tc) adalah 2:1 atau 60%: 30%. (Adkins, 1987; Robey, 1994).

3. Limfosit-B

Limfosit-B adalah sel yang menghasilkan molekul glikoprotein pada permukaan membrannya dan berfungsi sebagai penanda permukaan sel atau *marker* dan disebut imunoglobulin permukaan sel atau *surface immunoglobulin* (slg) dan molekul glikoprotein ini sekaligus bertindak sebagai reseptor. Pada sel plasma yaitu bentuk akhir dari limfosit-B, imunoglobulin akan disekresi dan memasuki aliran darah dengan kecepatan 2000 molekul per detik. Sel plasma hidup hanya beberapa hari (2-3 hari). Sel plasma merupakan sel efektor dari limfosit-B dengan ukuran lebih besar dari limfosit-T, kira-kira 8-12 mikron dengan khromatin mengelompok di tepi dan inti eksentrik. Secara morfologik terdapat 2 jenis sel plasma, yaitu sel plasma retikuler (sel plasma Maschalko) dan sel plasma limfatik dengan inti lebih kecil dan tidak eksentrik (Kincade, 1989; Ikuta , 1992; Stites, 1997).

4. Sel NK (*Natural Killer Cell*)

Sel NK diduga berasal dari limfoid stem sel sumsum tulang yang dikeluarkan sebagai sel NK precursor. Sel NK mampu membunuh sel sasaran secara alami. Aktivitas sel NK dihambat oleh MHC kelas I, karena mempunyai 2 jenis reseptor pada permukaan sel. Pertama reseptor yang memicu aktivitas sitotoksik dan kedua reseptor yang mengikat MHC kelas I sehingga aktivitas *killing* terhambat (Trinchieri, 1989; Imboden, 1997).

5. Sentroblas dan sentrosit

Sentroblas dan sentrosit terbentuk bila limfosit kecil dirangsang antigen, kemudian mengalami *blast formation* dan selanjutnya dalam jumlah banyak akan mengelompok membentuk senter jerminal (*germinal center*) atau senter reaktif (*reactive center*), karena itu disebut pula *follicular center cell* (FCC). Selanjutnya FCC akan berkembang menjadi *memory cell* dan *effector cell*. Secara morfologik sentroblas merupakan sel limfosit besar dengan sitoplasma basofilik, inti bulat atau oval, batas teratur, diameter 15-25 mikron dengan satu atau dua anak inti. Sentrosit berukuran 8-15 mikron berada diantara limfosit kecil dan sentroblas. Pada keadaan normal sentrosit tidak pernah berada diluar folikel tetapi pada KGB aktif, sentrosit dapat dijumpai diluar folikel (Stansfeld, 1985; Mac Lennan, 1994).

6. Imunoblas

Pada proses *blast formation* selanjutnya akan terbentuk imunoblas, yang secara morfologik mirip sentroblas. Secara fungsional imunoblas terdiri dari imunoblas-T dan imunoblas-B, walaupun secara morfologik sukar dibedakan. Imunoblas-B merupakan cikal bakal sel plasma yang mempunyai inti besar, vesikuler dengan sitoplasma penuh jaringan retikulum endoplasmik sehingga memberi warna basofilik. Perubahan kecerahan warna menunjukkan aktivitas imunoblas dan sering dijumpai diluar senter jerminal. Sitoplasma imunoblas-T banyak mengandung multiribosom yaitu 5 –15 ribosom (Stansfeld, 1985; Mac Lennan, 1994).

7. Sel plasma

Sel plasma merupakan sel penghasil antibodi dengan sitoplasma basofilik dan disertai bentukan seperti ruji-ruji sepeda dan inti eksentrik serta memberi warna merah magenta dengan pewarnaan PAS (*periodic acid Schiff*) dan tahan terhadap enzim diastase (Putra, 1984).

8. T- Plasmasitoid

Plasmatisit-T atau (*T-associated plasma cell*) adalah suatu sel khusus yang mirip dengan sel plasma mempunyai inti bulat, kadang-kadang eksentrik dan di dalam sitoplasma terdapat retikulum endoplasmik kasar. Sel ini hanya dijumpai di daerah limfosit-T, karena itu disebut juga *T-associated*

plasma cell. Sel ini merupakan bentuk sel limfosit-T yang mensekresi limfokin (Stansfeld, 1985; Mac Lennan, 1994).

2.7.2 Sel-sel non-limfoid

1. Sel retikulum

Sel retikulum dapat dibagi atas 4 jenis, yaitu sel retikulum histiositik, sel retikulum dendritik, sel retikulum *interdigitating* atau sel dendritik *interdigitating* dan sel retikulum fibroblastik atau *fibroblast* (Stansfeld, 1985).

a. Sel retikulum histiositik

Sel ini dijumpai pada semua bagian KGB dan tersebar merata, berbentuk oval dengan sebaran khromatin yang jelas, sitoplasma eosinofilik, sehingga memberi reaksi positif pada pewarnaan *acid phosphotase* dan *nonspecific esterase*. Pada keadaan aktif, sel membesar, membulat dan disebut makrofag. Inti makrofag bulat atau oval dengan banyak vakuole di sitoplasma yang berisi bahan-bahan yang telah dihancurkan. Jika gambaran sel seperti ini dijumpai pada senter jerminal, maka disebut *tingible body macrophage* dan bila gambaran sel seperti ini, dijumpai di daerah sinus KGB disebut *littoral* (Mac Lennan, 1994).

b. Sel retikulum dendritik

Sel retikulum dendritik berbentuk triangular dan kadang-kadang bulat

dengan membran inti tampak jelas. Sel-sel ini terdapat pada daerah senter jerminal KGB atau lebih tepat di daerah mantel atau *mantle zone*. Dengan menggunakan elektron mikroskop tampak adanya bentuk tidak beraturan dari membran dendritik yang mirip dengan pseudopoda. Selain dari bentuk dendritik yang kompleks ini, dendritik mempunyai kemampuan untuk bereaksi positif dengan enzim esterase non-spesifik (Mac Lennan, 1994).

c. Sel retikulum *interdigitating*

Sel ini mempunyai inti memanjang dan tidak teratur dengan sebaran khromatin halus dan mempunyai satu atau dua anak inti. Sitoplasma eosinofilik dan sel ini hanya terlihat di daerah limfosit-T, tidak bersifat fagositik dan memberi reaksi positif dengan pewarnaan enzim ATP-ase di membran dan enzim *acid phosphatase*, enzim non-spesifik esterase di sitoplasma (Mac Lennan, 1994).

d. Sel retikulum fibroblastik

Sel retikulum fibroblastik secara morfologik mempunyai persamaan dengan sel fibroblas di tempat lain, tetapi mempunyai fungsi yang berbeda. Sel ini berbentuk bintang, banyak dijumpai di sekitar pembuluh darah kecil daerah limfosit-T. Pada keadaan normal sel-sel ini membentuk jaringan retikulum dan tidak membentuk jaringan kolagen seperti biasanya. Sel memberi reaksi positif pada pewarnaan dengan enzim alkali fosfatase di

membran, enzim *acid phosphatase*, enzim non-spesifik esterase di sitoplasma (Mac Lennan, 1994)

2. Endotel pembuluh darah

Endotel pembuluh darah kecil dinamakan *post capillary venules* (pcv), pada KGB pcv disebut *high endothelial venules* (hev) dan dengan mikroskop cahaya tampak sel berbentuk kuboid yang mampu mengembang secara morfologik (Springer, 1994). Sel hev pada target organ mengekspresikan glikoprotein permukaan membran yang disebut *vascular addressin* (CD34 dan glyCAM-1) yang khas untuk setiap organ target. Setiap jenis addressin dikenal oleh satu atau lebih protein permukaan sel limfosit yang disebut *homing receptor* (L-selectin), sehingga limfosit yang mempunyai *homing receptor* sama cenderung kembali untuk berikatan dengan addressin pada target sel semula (Butcher, 1996).

3. Sel mast

Sel mast hanya dijumpai dalam jumlah sangat sedikit di dalam KGB, tetapi jumlah sel ini dapat meningkat pada keadaan KGB reaktif atau bila mengalami peradangan khronis. Sel ini memberi reaksi positif dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) dan seringkali dikelirukan dengan eosinofil. Berbeda dengan eosinofil, inti sel mast tidak menunjukkan dua lobus atau *bi-lobed* (Stansfeld, 1985).

4. Granulosit

Sel granulosit jenis neutrofil seringkali dijumpai di *sinus marginalis* kelenjar getah bening, walaupun dalam jumlah sedikit. Tetapi jumlah neutrofil akan meningkat bila terjadi peradangan akut, sedangkan eosinofil yang semula sedikit akan bertambah bila timbul reaksi alergi (Robb-Smith, 1981).

5. Makrofag

Aktivitas makrofag terhadap antigen spesifik sangat erat hubungannya dengan limfosit-T yang telah mengenal antigen tersebut sebelumnya. Begitu pula sitokin yang disekresi sel limfosit-CD4⁺T (Th) atau limfosit CD8⁺T (Tc) berfungsi meningkatkan atau menghambat aktivitas makrofag. Kemampuan *reciprocal* ini terutama ditunjukkan IL-2 (Romagnani, 1997). Makrofag mempunyai kemampuan untuk menelan dan mencerna patogen, antigen dan kemudian menghancurkannya. Makrofag mampu mensekresi sitokin antara lain, IL-1; IL-6; IL-8; IL-12, TNF- α (Janeway, 1999).

2.8 Sistem Imun Tikus

Penelitian ini menggunakan tikus putih *strain Wistar* yang telah dikembangkan di laboratorium riset Wistar - Norwegia untuk penelitian imunologi, terutama untuk penelitian obat-obatan (Paget, 1964; Baker, 1974). Sistem imun tikus, tidak banyak berbeda dengan manusia maupun mencit (Paget, 1964; Baker, 1974). Tikus *strain Wistar* mudah didapat di Indonesia, harga

relatif murah dan organ tubuh terutama kelenjar getah bening cukup besar, sehingga memudahkan penelitian. Limfosit T dibagi ke dalam 2 subpopulasi besar yaitu limfosit T penolong (Th) yang ditandai dengan $CD4^+$ dan limfosit T sitotoksik (Tc) yang ditandai dengan $CD8^+$ dan subpopulasi Limfosit T supresor (Kuby, 1992a; Male, 1994).

Pengelompokan limfosit T penolong ($CD4^+$) menjadi Th1 dan Th2 ditentukan oleh sitokin yang dihasilkan. Pada manusia, limfosit Th1 mensekresi $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, $TNF-\beta$, IL-2, IL-3 dan GM-CSF (Hobbs, 1995), sedangkan Th2 mensekresi IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, $TNF-\alpha$ dan GM-CSF (Hobbs, 1995; Romagnani, 1997). Sitokin yang disekresi Th1 penting untuk CMI yaitu Interferon gamma ($IFN-\gamma$) yang mengaktifkan makrofag, berfungsi pada Th1 fase protektif dan IL-2 mengaktifkan $CD8^+T$ berfungsi pada Th1 fase DTH (Griffin, 1994) Sedangkan sitokin yang dihasilkan Th2 bertanggungjawab terhadap sekresi antibodi. Polarisasi ini terjadi karena pengaruh *microenvironment* dan genetik. Begitu pula dengan limfosit Tc yang dapat dikelompokkan menjadi Tc1 dan Tc2 berdasarkan sitokin yang dihasilkannya (Romagnani, 1997). Sitokin yang dihasilkan Th1 dan Tc1 sama, begitu pula sitokin yang dihasilkan Th2 dan Tc2, karena itu sitokin yang dihasilkan Th maupun Tc dikelompokkan ke dalam sitokin tipe 1 dan tipe 2 (Romagnani, 1997). Limfosit $CD8^+T$ (Tc) dalam bentuk aktif CTL membunuh sel target melalui 2 cara, pertama melepaskan granula sitoplasmik

yang mengandung molekul racun (perforin) dan granzyme (Stites, 1997). Perforin menembus membran sel target, mengadakan agregasi dan membentuk porus dengan akibat terjadi disintegrasi osmotik pada sel target. Kedua mengekspresikan Fas ligan yang akan berinteraksi dengan Fas reseptor yang terdapat pada sel target. Hal yang sama dapat pula dilakukan limfosit CD4⁺T yang telah menjadi sel sitotoksik, walaupun jumlahnya sangat sedikit bila dibandingkan dengan limfosit CD8⁺T. Kerja perforin dan granzyme menyebabkan kematian melalui proses nekrosis (Laochumroovorapong, 1997).

Diferensiasi limfosit CD4⁺T menjadi 3 subset yaitu Th1 ditandai dengan sekresi IFN- γ , Th2 ditandai dengan sekresi IL-4 dan subset Th3 ditandai dengan sekresi TGF- β . Dengan demikian setiap sel yang mampu menghasilkan sitokin yang mirip dengan salah satu dari ketiga kelompok, digolongkan ke dalam sel Th tipe 1 (IFN- γ), sel Th tipe 2 (IL-4) dan sel Th tipe 3 atau TGF- β (Mosmann, 1996).

2.9 Sistem Imun Tubuh Manusia

Pertahanan tubuh terhadap patogen / benda asing, dilaksanakan oleh sistem imun yang terdiri dari imunitas non-spesifik atau imunitas alamiah (*natural / innate immunity*) dan imunitas spesifik atau imunitas didapat (*adaptive / acquired immunity*). Imunitas spesifik dibedakan dengan imunitas

alamiah karena mempunyai sifat spesifisitas, diversitas, adanya memori, pengenalan akan *self* dan *non-self*. Imunitas spesifik dilaksanakan oleh sel-sel yang membentuk jaringan limforetikuler, dahulu dikenal dengan sistem retikuloendotelial dan letaknya tersebar di seluruh tubuh. Berbagai jenis sel ini akan memberi respons yang berbeda sesuai dengan fungsinya masing-masing terhadap rangsangan. Sistem imun tubuh sebagai alat pertahanan mempunyai tiga fungsi, yaitu:

- Pertahanan tubuh terhadap benda asing yang datang dari luar
- Menjaga keseimbangan tubuh (homeostasis), untuk mengeliminir jaringan tubuh yang rusak atau tua serta sisa-sisa anabolisme
- Perondaan (*surveillance*), untuk mengawasi serta mengeliminir sel-sel mutan yang dapat membahayakan tubuh (Stites, 1997; Peakman, 1997b)

Salah satu sifat penting dari sistem imun adalah kemampuan mengenal zat yang berasal dari dirinya sendiri (*self*) dan sel yang datang dari luar (*non-self*) dan proses pengenalan *self* dan *non-self*, telah dilaksanakan di timus melalui proses negatif seleksi dan positif seleksi. Bagi sel thimosit yang menunjukkan negatif seleksi, artinya bereaksi dengan sel dirinya sendiri atau menganggap sel diri sendiri sebagai musuh, akan dibunuh oleh tubuh melalui program bunuh diri atau *apoptosis*. Karena itu negatif seleksi dikenal sebagai *apoptosis-dependent phenomenon*. Sedangkan sel-sel bereaksi positif pada seleksi akan tetap hidup, mengadakan proliferasi dan berdiferensiasi menjadi

limfosit CD4⁺T dan limfosit CD8⁺T dengan subsetnya (Weyand, 1997; Peakman, 1997a).

2.9.1 Respons imun

Untuk mempertahankan diri dari patogen / antigen, tubuh mempunyai beberapa jenis sel yaitu sel darah putih (granulosit), sel monosit dan sel dendritik, sel-sel limfosit dan sel NK. Sedangkan organ yang paling berperan pada sistem imun adalah organ limfoid, yang terdiri dari organ limfoid primer yaitu sumsum tulang dan kelenjar timus dan organ limfoid sekunder yaitu limfonodul dan limpa (Peakman, 1997b).

Imunitas alamiah, atau *natural / innate immunity* merupakan pertahanan tubuh pertama dan tidak spesifik, berupa hambatan fisik, seperti suhu, perbedaan pH, keringat, kulit utuh, mukos dan sekresi sel / kelenjar, enzim-enzim dan komplemen. Dikenal sebagai respons imun humoral dari natural imunitas, sedangkan netrofil, eosinofil, sel mast, sel NK disebut respons imun seluler dari natural imunitas. Makrofag merupakan sel yang unik, karena penting sebagai fagosit pada natural imunitas, juga sangat penting sebagai fagosit serta membantu kerja sel limfosit T pada *acquired immunity* (Peakman, 1997a; Parslow TG, 1997b). Imunitas didapat atau (*adaptive / acquired immunity*), diwakili oleh sel-sel limfosit T untuk respons imun seluler dan limfosit B / sel plasma serta sekresinya berupa imunoglobulin untuk

respons imun humoral. Secara teoritis kedua respons imunitas alamiah dan imunitas didapat terpisah, tetapi secara praktis keduanya saling berinteraksi (Peakman, 1997c; Parslow TG, 1997a).

2.9.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya Th1 dan Th2

Pada manusia fungsi utama dan sifat penotipe Th1 dan Th2 sedikit berlainan dengan tikus maupun mencit. Kalau kemampuan sekresi sitokin diberi tanda (+), maka Th1 akan mensekresi IFN- γ dan TNF- β (+++) sedangkan Th2 (-). Untuk IL-2 dan TNF- α , Th1 (+++) dan Th2 (++) . Kebalikannya IL-4 dan IL-5, Th2 (+++), tetapi Th1 (-) dan untuk IL-6, IL-10, IL-13, Th2 (+++) dan Th1 (++) . GM-CSF kedua-duanya Th1 dan Th2 mampu mensekresi dengan jumlah yang seimbang (Romagnani, 1996).

Pada tabel 2.1 di bawah ini dapat dilihat beberapa kondisi atau bahan yang dapat mempengaruhi Th0 berdiferensiasi menjadi Th1 atau Th2. Penelitian membuktikan bahwa limfosit CD4⁺ (Th1) dan (Th2) berasal dari prekursor yang berbeda, tetapi cukup banyak penelitian lain telah membuktikan bahwa satu prekursor saja dapat berdiferensiasi menjadi Th1 atau Th2. Pada mencit perubahan Th0 menjadi Th1 dan Th2, dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan mikro, walaupun mekanismenya sampai sekarang belum jelas (Kamogawa, 1993; Openshaw, 1995).

Dari faktor lingkungan, dapat dijelaskan bahwa peranan tempat antigen dipresentasikan, bentuk fisik imunogen, jenis ajuvan dan dosis antigen menentukan terbentuknya Th1 atau Th2. Sebagai contoh, imunisasi melalui parenteral dapat mendorong terbentuknya Th1 atau Th2 sedangkan imunisasi per inhalasi atau per oral lebih meningkatkan Th2. Antigen terlarut dapat meningkatkan Th1 maupun Th2, sedangkan ag dalam bentuk korpuskolat lebih berperan pada perubahan Th1.

Ajuvan CFA lebih berperan pada Th1 sedangkan alum dan toksin dari *Bordetella pertusis* lebih berperan pada peningkatan Th2. Sitokin IL-12 + IFN- γ atau IFN- α meningkatkan Th1, sedangkan IL-4 meningkatkan Th2.

Hormon glukokortikoid, vitamin D₃ atau 25 (OH) D₃ dan progesteron memicu terjadinya perubahan Th0 menjadi Th2, sedangkan hormon relaxin, dan androgen merubah Th0 menjadi Th1. Sel-sel APC mempunyai kemampuan yang sama besarnya untuk mempengaruhi Th0 untuk menjadi Th1 atau Th2. Lihat tabel 2.1 di bawah (Romagnani, 1996).

Antigen dosis rendah sampai sedang (*medium-low*) diduga memicu terjadinya DTH, karena Th1 lebih dominan, sedangkan antigen dosis tinggi dan dosis sangat kecil merangsang imunitas humoral, terlihat dengan meningkatnya Th2 (Bretscher, 1992). Penelitian dengan CD4⁺T *naïve* dari *transgenic mice*, membuktikan bahwa antigen dosis tinggi memicu respon Th1, sedangkan dengan peptida dosis rendah Th0 berdiferensiasi menjadi Th2 (Pfeiffer, 1995).

Tabel 2.1 Faktor-faktor yang ikut mempengaruhi diferensiasi sel CD4⁺T ke dalam penotipe Th1 atau Th2.

Factors	Th1	Th2
Cytokines		
IL-12 + IFN- γ (or IFN- α)	+++	
TGF- β	+	
IL-4		+++
IL-10		+
Hormones		
Glucocorticoids		+
Androgen steroids	+	
25 (OH) D3		+
Progesteron		+
Relaxin	+	
APCs		
Professional APC (macrophages, dendritic cells, B cells)	+	+
Keratinocytes		+
Adjuvants		
CFA	+	
Alum		+
<i>Bordetella pertussis toxin</i> 1		+
Costimulatory molecules		
B7.1	+	+
B7.2		+
CD30L		+
CD4		+
Physical form of the immunogen		
Corpuscolate	+	
Soluble	+	+
Dose of antigen		
High		+
Medium-Low	+	
Very low		+
Peptide density		
High	+	
Low		+
Peptide affinity to MHC		
High	+	
Low		+

(Kamogawa, 1993; Openshaw, 1995).

Percobaan dengan mencit transgenik, menunjukkan peningkatan aktivitas Th1 bila diberi antigen dosis kecil. Bila dosis antigen dinaikkan IFN- γ menghilang dan muncul sel-sel yang mampu menghasilkan

IL-4. Bila antigen dengan dosis sangat rendah diberikan pada mencit yang sama, sekresi IL-4 tetap lebih dominan daripada IFN- γ (O'Garra, 1995).

Selanjutnya densitas peptida serta afinitas peptida juga ikut menentukan profil sitokin, walaupun percobaan menggunakan mencit transgenik yang sama, seperti yang terlihat pada tabel 2.1 di atas (Reiner, 1993).

Dari tabel 2.1 di atas dapat diambil suatu manfaat bagi penelitian ini yaitu, bahwa ajuvan mempunyai kemampuan memicu CD4⁺T naïve untuk berdiferensiasi ke dalam subset Th1 dan Th2. Misalnya CFA menyebabkan CD4⁺T naïve berdiferensiasi ke Th1, sedangkan alum dan *B.pertusis* menyebabkan CD4⁺T naïve berdiferensiasi ke Th2. Dengan demikian dapat dipahami apabila komponen yang terkandung di dalam EMCA maupun FTECA akan menyebabkan CD4⁺T naïve berdiferensiasi ke salah satu subset tersebut.

Merujuk pada sitokin yang disekresi sel-sel Th1, Th2 dan Th3, maka sel yang menghasilkan sitokin seperti yang disekresi Th1 terutama IFN- γ disebut sel tipe 1 (*Th1-like*), sel yang mensekresi sitokin seperti Th2 terutama IL-4 disebut sel tipe 2 (*Th2-like*) dan sel tipe 3 (*Th3-like*), apabila yang disekresi terutama TGF- β (Mosmann, 1996).

2.9.3 Respons imun terhadap tuberkulosis paru mencit

M.tuberculosis mulai memperbanyak diri di dalam fagosom pada waktu proses fagositosis sedang berlangsung. Sejumlah protein yang disekresi

selama proses fisi di dalam fagosom akan diproses melalui *endosomic pathway* dan dipresentasikan oleh MHC kelas II ke CD4⁺T. Sebagian protein yang memasuki sitoplasma makrofag akan diproses dan dipresentasikan melalui MHC kelas I ke CD8⁺T. Beberapa sekret *M.tuberculosis* menghambat fusi fagosom dan lisosom, sehingga tidak terbentuk fagolisosom (Orme, 1995). Penelitian *in vitro* membuktikan limfosit CD8⁺T bersifat protektif, bila tikus terpapar *M.tuberculosis* dosis letal per erosol, sedangkan CD4⁺T tidak bersifat protektif. Bila tikus diberi *M.tuberculosis* dibawah dosis letal, CD4⁺T bersifat protektif sedangkan CD8⁺T tidak protektif (Orme, 1987; Lee, 1991).

Griffin pada tahun 1994, mendapatkan 4 subset limfosit CD4⁺T berdasarkan marker yang diekspresikan pada permukaan membran sel. Limfosit CD4⁺T naïve mempunyai marker CD44^{mod} CD45RB^{mod}. Tiga diantaranya bersifat protektif, sitolisis dan DTH. Tujuh hari setelah terpapar dengan *M.tuberculosis*, CD4⁺T memperlihatkan sifat protektif dengan menampilkan marker CD44^{hi} pada 2/3 populasi mencit dan marker CD44^{hi}CD45RB^{hi} pada 1/3 populasi mencit. Empatbelas hari setelah terpapar dengan *M. tuberculosis* timbul sitolisis CD4⁺T mengekspresikan CD44^{hi}CD45RB^{lo/neg} yang dijumpai pada sebagian besar mencit (Griffin, 1994). Tiga minggu setelah inokulasi CD4⁺T akan berubah menjadi memori sel disertai DTH dan peristiwa ini ditandai dengan meningkatnya marker CD45RB^{LO/neg} diikuti dengan penurunan populasi dengan marker CD44^{hi}CD45RB^{hi} dan CD44^{hi}CD45RB^{mod}. (Budd, 1987; Griffin, 1994).

Pada mencit yang terinfeksi *M.tuberculosis*, sebagian besar populasi CD4⁺T mensekresi IFN- γ , hanya sebagian kecil IFN- γ disekresi CD8⁺T (Orme, 1992). Sekresi IFN- γ terjadi pada fase akut yaitu hari ke 10 sampai hari ke 20 dan pada hari ke 40 pada saat dimulainya fase khronis sekresi IFN- γ menghilang. Limfosit CD4⁺T mulai memproduksi IL-4. Perubahan ini dapat diartikan sebagai berikut, pertama aktivasi CD4 Th2 diperlukan untuk membuang tumpukan *M.tuberculosis* yang mati dan kedua untuk menghambat aktivitas CD4T (Th1). Aktivitas sekresi IFN- γ dilaksanakan oleh CD4⁺T protektif (Kawamura,1992) dan IFN- γ akan meningkatkan produksi TNF dari makrofag. Ada 3 peranan TNF pada aktivitas sel, pertama mempercepat terbentuknya granuloma, kedua bersifat antimikrobiaal dan mempunyai fungsi autokrin dan ketiga sebagai penyebab timbulnya beberapa manifestasi imunopatologik pada mencit yang terpapar *M.tuberculosis* (Kindler, 1989).

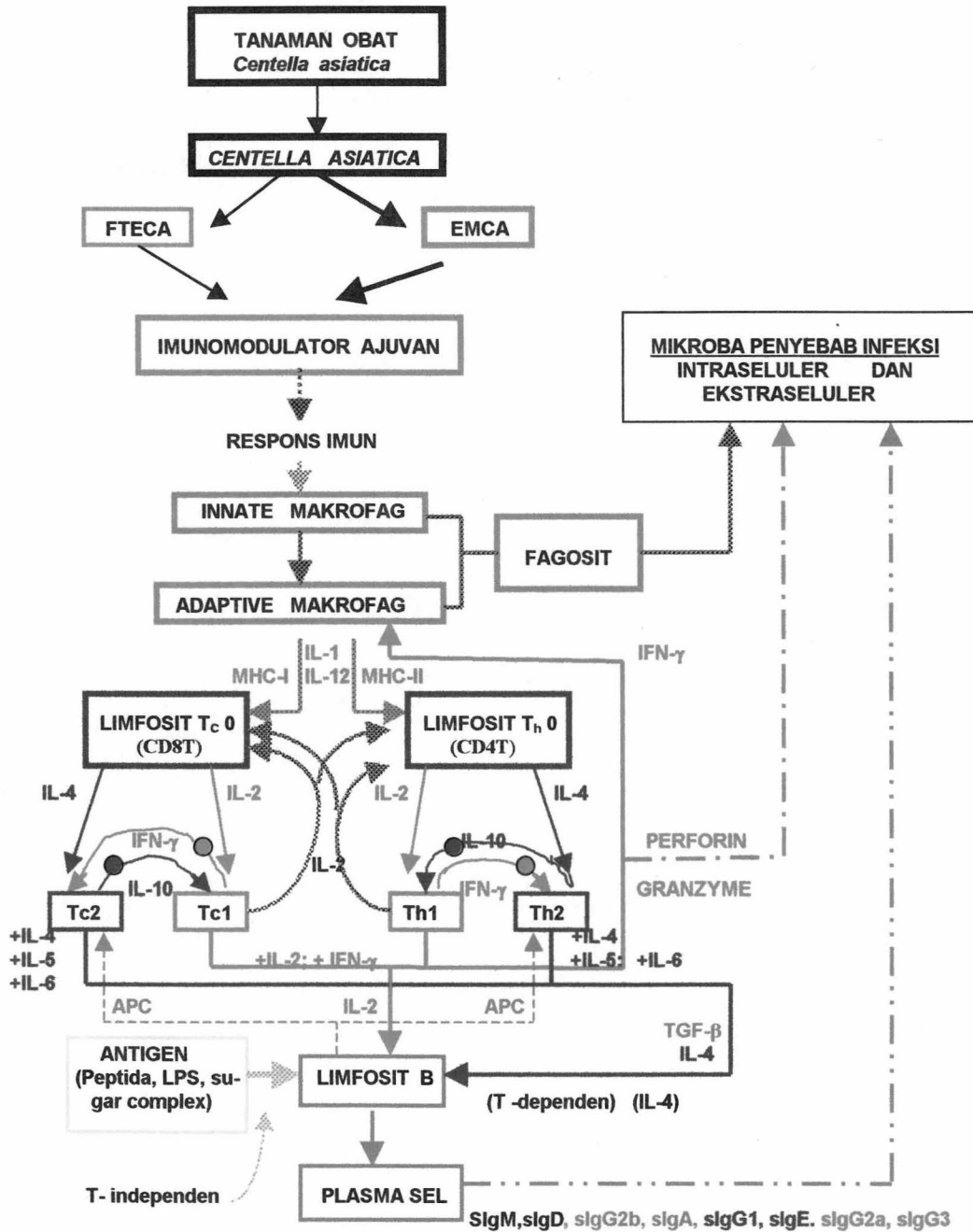
Interleukin -12 memicu CD4⁺T untuk menghasilkan IFN- γ dan IL-12 dapat menghambat pertumbuhan *M.tuberculosis* pada fase akut dari imunitas protektif setelah infeksi berjalan 10 hingga 20 hari. Keterlibatan IL-12 pada pembentukan granuloma pada DTH belum jelas (Cooper, 1995).

BAB 3

Bab 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Skema 3.1 Kerangka konseptual penelitian

Penjelasan:

- = EMCA atau FTECA sebagai imunomodulator
- = jalur aktivasi makrofag oleh stimulator ajuvan EMCA
- = jalur aktivasi makrofag oleh stimulator FTECA
- = jalur kerja *innate macrophage* dan *adaptive macrophage* sebagai fagosit
- = jalur ekspresi MHC I dan MHC II oleh makrofag
- = jalur aktivasi makrofag oleh sitokin Th1 dan Tc1 dan
- = kerja perforin dan granzyme pada sel target.
- = jalur aktivasi limfosit-B oleh sitokin Th2 dan Tc2
- = jalur sel B sebagai APC mengaktifasi limfosit T
- = jalur sel B berdiferensiasi menjadi sel plasma
- = jalur sel plasma mensekresi imunoglobulin
- = bahan bersifat mutagenik memicu limfosit B melalui jalur T-independen.
- = IL-2 dengan cara otokrin dan parakrin mengaktifkan Tc1 dan Th1.

Kerangka konseptual merupakan penjabaran paradigma psikoneuroimmunologis dari sistem imun yang berkonsep pada pengaruh stimulan ajuvan terhadap aktivitas makrofag dan limfosit T untuk meningkatkan respons imun, sekaligus sebagai landasan konsep untuk menjawab permasalahan penelitian ini. Karena triterpenoid saponin EMCA dan FTECA adalah ajuvan, berfungsi sebagai stimulator yang dapat memicu / membangkitkan respons imun, sehingga EMCA merupakan imunomodulator yang bersifat imunostimulator untuk aktivitas CD4⁺T dan MØ dan sebagai immunosupresor pada aktivitas CD8⁺T. Sedangkan FTECA berfungsi sebagai imunostimulator pada proliferasi CD4⁺T, MØ dan terutama CD8⁺T serta immunosupresi terhadap sekresi IFN- γ oleh CD4⁺T atau CD8⁺T.

Dari tanaman *Centella asiatica* diambil 2 macam bahan, yaitu EMCA

yang mengandung semua komponen yang terlarut dalam metanol dan FTECA yang mengandung *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid*. Keduanya mengandung triterpenoid saponin dalam jumlah berbeda yang bersifat stimulator ajuvan dan dapat membangkitkan aktivitas *innate* makrofag. *Innate* makrofag yang menjadi lebih aktif, mampu memfagositosis mikroorganisme intraseluler. Disamping itu *innate* makrofag yang terpapar EMCA atau FTECA akan berubah menjadi *adaptive* makrofag. *Adaptive* makrofag menghasilkan IL-1, IL-6, IL-12 mampu mengaktivasi limfosit CD4⁺T. Dengan bantuan MHC kelas I makrofag akan mempresentasikan antigen ke limfosit CD8⁺T dan dengan bantuan MHC kelas II akan mempresentasikan antigen ke limfosit CD4⁺T. Selanjutnya limfosit CD4⁺T aktif akan memsekresi IL-2, IFN- γ , IL-4 dan IL-5. Berdasarkan sitokin yang disekresinya limfosit CD4⁺T (Th0) dan limfosit CD8⁺T (Tc0), dibagi lagi ke dalam subset Th1 dan Th2 serta subset Tc1 dan Tc2. Bilamana sitokin IL-2 dan IFN- γ yang dominan, maka Th0 akan menjadi Th1 dan Tc1. Bilamana IL-4 dan IL-5 yang dominan, maka Tc0 akan menjadi Tc1 dan Tc2. Sebagian kecil limfosit Th1 dan sebagian besar Tc1 akan mensekresi perforin dan granzyme yang mampu melubangi atau membuat pori sehingga dapat membunuh mikroorganisme dan sel target secara langsung. Sebagian besar Th1 akan mensekresi IFN- γ yang berfungsi mengaktivasi makrofag menjadi fagosit yang lebih aktif serta mengaktifkan sel-sel yang berada disekitar sel terinfeksi untuk memproduksi protein yang mampu mencegah invasi virus. IL-2 yang disekresi Th1 selanjutnya akan

mengaktifkan Th0 menjadi Th1 dan Th2 atau dirinya sendiri melalui proses otokrin, parakrin dan endokrin serta mengaktifkan Tc menjadi Tc1 dan Tc2. Limfosit Th2 dan Tc2 akan memicu limfosit B untuk berproliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma yang mampu mensekresi imunoglobulin. Limfosit Th0 dapat pula diaktifkan oleh limfosit B yang bertindak sebagai sel APC. Berbagai bahan seperti peptida, lipopolisakarida (LPS) yang merupakan endotoksin serta gula kompleks dapat mengaktifkan limfosit B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mampu mensekresi imunoglobulin. Berdasarkan uraian di atas disertai keterbatasan dana, dipilihlah beberapa variabel yang dapat memenuhi pembuktian bahwa EMCA dan FTECA adalah suatu stimulator ajuvan yang dapat membangkitkan respons imun seluler dan respons imun humoral, yaitu variabel $CD4^+T$, $CD8^+T$, $M\emptyset$, $IFN-\gamma$ mewakili imunitas seluler dan $sIgA$, $sIgG$ dan $sIgM$ mewakili imunitas humoral.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian larutan EMCA per oral, dapat meningkatkan respons imun seluler dan respons imun humoral di daerah parakorteks KGB mesenterium tikus lebih besar dari peningkatan respons imun yang disebabkan pemberian larutan garam faali.
2. Pemberian larutan FTECA per oral dapat meningkatkan respons imun seluler dan respons imun humoral di daerah parakorteks KGB mesen-

terium tikus lebih besar dari peningkatan respons imun yang disebabkan pemberian larutan garam faali.

3. Perubahan respons imun seluler dan humoral pada daerah parakorteks kelenjar getah bening mesenterium tikus karena paparan EMCA berbeda sesuai dengan dosis yang diberikan yaitu 187,50 μg ; 375,0 μg ; dan 750,0 μg per 100 gram berat badan tikus.
 4. Pola respons imun seluler dan humoral pada daerah parakorteks kelenjar getah bening mesenterium tikus, karena paparan larutan EMCA berbeda sesuai dengan besarnya dosis perlakuan yang diberikan, yaitu 187,50 μg ; 375,0 μg ; dan 750,0 μg per 100 gram berat badan tikus.
-

BAB 4

Bab 4

METODE PENELITIAN

4.1 Metode Penelitian

4.1.1 Jenis penelitian

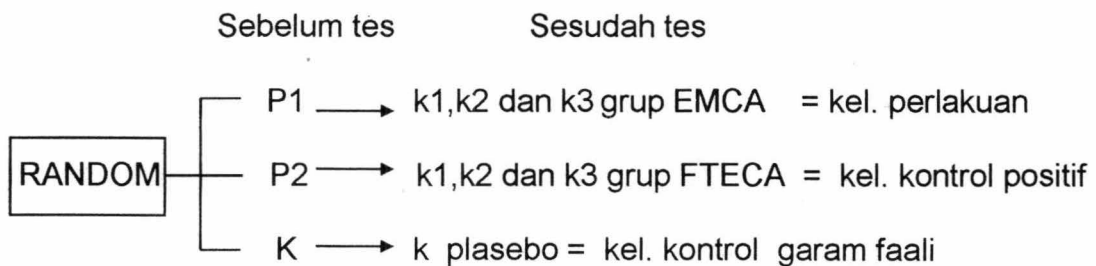
Jenis penelitian adalah penelitian eksperimental. Karena penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh paparan EMCA terhadap respons imun seluler dan respons imun humoral tikus dan membandingkannya dengan kelompok tikus yang terpapar larutan FTECA sebagai kontrol positif dan larutan garam faali sebagai kontrol negatif atau kontrol plasebo. Organ yang dipergunakan untuk menilai adanya perubahan respons imun tersebut adalah kelenjar getah bening mesenterium yang diperoleh dari tikus yang telah diotopsi. Dari sediaan objek gelas yang dibuat dari KGB grup EMCA, grup FTECA dan kelompok kontrol plasebo. Untuk mengetahui adanya perbedaan diantara ketiga grup tersebut, maka dilakukan analisis multivariat dan univariat untuk menentukan besarnya perbedaan respons imun yang terjadi diantara ke tujuh variabel yang diukur dari ketiga grup tadi.

Pada penelitian eksperimental, beberapa prinsip yang harus dipenuhi adalah pertama kesamaan perlakuan pada sejumlah sampel yang ikut dalam penelitian, kedua pengambilan sampel secara acak atau proses randomisasi untuk semua sampel yang ikut dalam penelitian, dan ketiga ada kelompok perlakuan EMCA dan ada kelompok kontrol positif FTECA atau fraksi

terstandar ekstrak *Centella asiatica* dan kontrol plasebo (Widodo , 1993).

4.1.2 Rancangan penelitian

Pemecahan masalah dalam penelitian ini, menggunakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *the post test only control group design* dengan uji statistik anova, manova (Gasperz , 1992a; Gasperz , 1992b). Dipilihnya rancangan tersebut karena diasumsikan bahwa di dalam suatu populasi tertentu, terdapat homogenisasi tiap unit populasi. Dengan kata lain karakteristik antar unit populasi sama, karena itu pula pengukuran awal tidak dilakukan, karena dianggap sama kondisinya (Widodo, 1993).



Skema 4.1 Rancangan desain uji respons imun tikus putih sebelum dan sesudah diberi EMCA, FTECA dan kontrol plasebo.

Kel = kelompok

P1 dan P2 = kelompok perlakuan.

P1 = kel. perlakuan EMCA, disebut k1 EMCA dg dosis 187,50 µg;

k2 EMCA dg dosis 375,0 µg; k3 EMCA dg dosis 750,0 µg .

P2 = kel. kontrol FTECA, disebut k1 FTECA dg dosis 187,50 µg;

k2 FTECA, dg dosis 375,0 µg; k3 FTECA dg dosis 750,0 µg .

K = kel. kontrol atau kelompok plasebo diberi garam faali.

k1,k2,dan k3 EMCA = kel. observasi dari grup EMCA

k1,k2,dan k3 FTECA = kel. observasi dari grup FTECA

Pembagian kelompok ini dipergubakan juga pada pengolahan data.

4.1.3 Pendekatan

Penelitian menggunakan paradigma psikoneuroimunologis, dengan konsep ajuvan sebagai suatu modulator. Bila EMCA berfungsi sebagai *adjuvant modulator*, maka akan terjadi peningkatan atau penurunan jumlah limfosit CD4⁺T, limfosit CD8⁺T, makrofag dan IFN- γ serta imunoglobulin permukaan slg A, slgG, slgM yang disekresi imunoblas B dan sel plasma. Besarnya perubahan yang terjadi dicari harga rerata dan simpang bakunya. Dengan menggunakan analisis multivariat dicari variabel pembeda yang menentukan pola variabel parakorteks KGB yang diukur dan dari analisis diskriminan dicari besaran koefisien Fisher yang ikut menentukan terbentuknya pola tersebut. Kemudian perkalian data asli dengan koefisien Fisher yang diperoleh dari selisih perbedaan (harga delta), menggambarkan perubahan variabel yang dapat dipolakan dalam bentuk grafik pola perbedaan perubahan variabel karena perlakuan EMCA dengan kontrol plasebo, grafik pola perbedaan perubahan variabel karena kontrol positif FTECA dengan kontrol plasebo dan grafik pola perbedaan perubahan variabel karena perlakuan EMCA dengan kontrol positif FTECA (Gaspersz, 1992b).

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Sampling

4.2.1 Populasi tikus

Populasi tikus yang dipergunakan adalah *Rattus norvegicus strain Winstar* yang dibiakkan di laboratorium hewan coba bersama Unair dan berasal dari Institut Teknologi Bandung.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian 110 tikus terdiri dari 45 ekor untuk grup perlakuan EMCA, 45 ekor untuk grup kontrol FTECA dan 20 ekor kontrol plasebo. Berat tikus 95-120 gram berjenis kelamin jantan dan berumur kira-kira 2-3 bulan. Untuk mengatasi kemungkinan *drop out*, maka masing-masing grup terdiri dari 15, berarti untuk setiap kelompok perlakuan EMCA dan kelompok kontrol FTECA terdapat kelebihan 5 ekor tikus. Kelompok kontrol plasebo dilebihkan 10 ekor. Pada akhir penelitian ada atau tidak ada tikus yang *drop out*, cara pengambilan kesepuluh tikus yang ikut dalam setiap kelompok penelitian adalah secara random.

4.2.3 Besar sampel

Besarnya sampel yang dipergunakan pada penelitian ini ditentukan dengan memakai rumus, untuk populasi (N) yang tidak diketahui pada kelompok yang berpasangan (Widodo, 1993).

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

Skema 4.2. Rumus yang dipergunakan untuk menghitung besar sampel pada penelitian.

n = besarnya masing-masing kelompok sampel

Z_{α} = nilai standar normal yang besarnya tergantung α .

$\alpha = 0,05 \rightarrow Z = 1,96$; $\alpha = 0,01 \rightarrow Z = 2,57$; Z_{β} = nilai yang diperoleh dari tabel yang telah ditentukan. β = power test

Untuk grup yang berpasangan (*matching*) $QD^2/d^2 = 1$, sehingga diperoleh n sebagai berikut :

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

Pada penelitian ini, $Z_{\alpha} = 1,96$ dan $Z_{\beta} = 1,28$; sehingga akan diperoleh $\rightarrow n = (1,96 + 1,28)^2 = 10,49 = 10$.

Berdasarkan tabel *Number of observations for t-test of difference between two means*, untuk $\alpha = 0,05$ besar sampel masing-masing kelompok = 10,49. Bila angka tersebut dibulatkan, maka penelitian ini akan menggunakan 10 ekor tikus pada setiap kelompok (Widodo, 1993), sehingga keseluruhan tikus yang dipergunakan adalah 70 ekor.

4.2.4 Teknik sampling

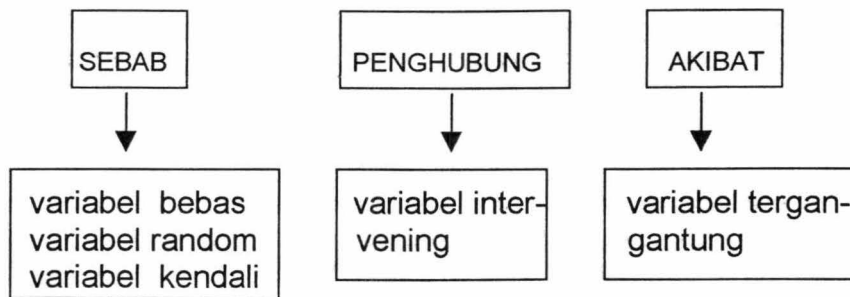
Teknik pengambilan sampel atau teknik sampling dilakukan dengan cara " *simple random sampling* ". Dengan alasan walaupun populasi tikus yang dipelihara telah diusahakan dalam kondisi sama, misalnya makanan & minuman, jenis kelamin dan strain tikus, tetapi masih ada perbedaan dalam hal berat badan. Perbedaan berat badan ada hubungannya dengan beda jumlah sel imunokompeten di dalam tubuh (Paget, 1964; Baker, 1974).

Randomisasi dilakukan dengan memberi nomor tikus dari 01 sampai 99. Kemudian dengan memakai tabel random, dua digit atau tiga digit dicari tikus yang ikut penelitian. Contoh: jatuhkan pensil pada tabel random 2 digit, diperoleh nomor 32, maka tikus yang terpilih adalah nomor 32, 45, 46, 14 dan 76. Cara ini diulang lagi sampai seluruh tikus yang berjumlah 110 ekor terpilih untuk penelitian dan ditetapkan nomor genap untuk perlakuan EMCA, nomor ganjil untuk kontrol FTECA dan kontrol plasebo (Arjatmo, 1981).

4.3 Identifikasi dan Pengukuran Variabel Penelitian

4.3.1 Hubungan antar variabel

Hubungan antar variabel yang ikut dalam penelitian, dapat dilihat pada skema di bawah ini:



Skema 4.3 Hubungan antar variabel dalam penelitian ini

Uraian:

Variabel bebas : Konsentrasi EMCA dan FTECA. Kelompok 1 dosis 187,50 μg , kelompok 2 dosis 375,0 μg dan kelompok 3 dengan dosis 750,0 μg per 100 berat badan tikus.

Variabel moderator: EMCA dibuat di laboratorium Fitokimia FF Unair dan FTECA diperoleh sebagai sediaan siap pakai..

Variabel random : berat badan tikus, umur dan kesempatan untuk setiap tikus ikut dalam penelitian.

Variabel penghubung: cara kerja EMCA dan FTECA dalam mempengaruhi sistem imun kelenjar getah bening tikus.

Variabel kendali : strain tikus, jantan dan sehat, kandang bersih, makanan pelet 521 dan minuman direbus. Prosedur pemberian bahan perlakuan & plasebo. Teknik dan prosedur pengambilan kelenjar getah bening. Teknik pengawetan KGB, teknik pembuatan sediaan, teknik pewarnaan, teknik pembacaan sediaan.

Variabel *intervening*: Subjektivitas setiap pengamat yang membaca sediaan

an objek gelas. Keterkaitan satu variabel dengan variabel lainnya.

Variabel tergantung : Perubahan respons imun tikus yang dijabarkan pada perubahan limfosit-CD4⁺T limfosit-CD8⁺T, sel makrofag, sekresi IFN- γ serta imunoglobulin permukaan, sIgG, sIg A dan sIg M.

4.3.2 Definisi operasional variabel

1. EMCA adalah ekstrak metanol *Centella asiatica* merupakan bahan perlakuan yang diberikan kepada tikus dengan dosis tertentu yaitu 187,50 μg ; 375,0 μg ; 750 μg yang dilarutkan dalam 1,5 ml larutan garam faali dan diberikan per oral. Pemberian menggunakan semprit berjarum tumpul (bundaran logam diujungnya).
2. FTECA adalah fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* merupakan kontrol positif yang diberikan kepada tikus dengan dosis tertentu yaitu 187,50 μg ; 375,0 μg ; 750 μg yang dilarutkan dalam 1,5 ml larutan garam faali dan diberikan per oral. Pemberian menggunakan semprit berjarum tumpul (bundaran logam diujungnya).
3. Larutan garam faali adalah larutan yang berisi 0,9 % NaCl yang bersifat isotonis, sehingga tidak menyebabkan perubahan dalam tonus sel.
4. Kelompok 1 adalah kelompok tikus yang diberi EMCA atau FTECA dengan dosis 187,50 μg ; Kelompok 2 adalah kelompok tikus yang diberi EMCA atau FTECA dengan dosis 375,0 μg ; Kelompok 3 adalah kelompok tikus yang diberi EMCA atau FTE CA dengan dosis 750,0

μg per 100 gram berat badan tikus.

5. Variabel $\text{CD4}^+\text{T}$, $\text{CD8}^+\text{T}$, $\text{M}\phi$ adalah limfosit $\text{CD4}^+\text{T}$, limfosit $\text{CD8}^+\text{T}$ dan makrofag yang mengikat warna coklat pada sebagian atau seluruh sel, karena ada interaksi antara reseptor sel dengan antibodi monoklonal yang spesifik dan indikator warna coklat setelah dilakukan proses pewarnaan imunohistokimia dengan 3,3' di amino benzidine (DAB).
6. Variabel $\text{IFN-}\gamma$ adalah limfosit $\text{CD4}^+\text{T}$ (Th1) dan limfosit $\text{CD8}^+\text{T}$ (Tc1) yang memproduksi $\text{IFN-}\gamma$ di dalam sitosolnya, yang dapat berinteraksi dengan antibodi monoklonal spesifik dan indikator warna coklat, sehingga memberi warna coklat pada sebagian atau seluruh sel setelah dilakukan proses pewarnaan imunohistokimia.
7. Variabel sIgG, sIgA dan sIgM adalah imunoglobulin permukaan G,A dan M yang disekresi oleh limfoblas B dan memberi warna coklat setelah berinteraksi dengan antibodi monoklonal dan indikator warna coklat sehingga memberi warna coklat pada sebagian atau seluruh sel setelah dilakukan proses pewarnaan imunohistokimia.

4.3.3 Bahan penelitian

1. *Centella asiatica* berasal dari Materia Medika di Batu-Malang. Kemudian dibikin bubuk di laboratorium Fitokimia dan selanjutnya di ekstraksi dengan menggunakan metanol. Dengan bantuan *rotary evaporator* dan *freeze drying*, diperoleh serbuk coklat muda.

2. FTECA adalah tablet yang mengandung *asiaticoside* 40% atau 4 mg, *asiatic acid* 30% atau 3 mg dan *madecassic acid* 30% atau 3 mg (Maquart, 1990).
3. Larutan garam faali atau *normal saline*, adalah larutan garam dengan konsentrasi 0,9% NaCl.

4.3.4 Persiapan bahan penelitian

4.3.4.1 Persiapan EMCA

1. Limapuluh kg daun pegagan basah dianginkan di tempat terbuka / terlindung sinar matahari selama 7 hari dan diperoleh 5 kg daun kering
2. Ekstraksi metanol dan penguapan dengan *rotary evaporator* dari satu kg serbuk pegagan diperoleh 495 gram larutan kental berwarna hijau tua
3. Selanjutnya dari 250 gram larutan kental-hijau diperoleh 6,75 gram serbuk kering *Centella asiatica* yang berwarna coklat muda, setelah dikeringkan dengan alat pengering vakum dingin (*freeze dryer*),
4. Komponen *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* di dalam EMCA dibuktikan, dengan alat *high pressure liquid chromatography (HPLC)*-merek Perkin Elmer Corp.USA.
5. Untuk memperoleh dosis yang sama, maka rasio FTECA 20 X EMCA .
6. Setiap pemberian EMCA dan FTECA terlebih dahulu dilarutkan dalam 1,5 ml larutan garam faali.

4.3.4.2 Persiapan FTECA

Duapuluh tablet yang berisi FTECA, dijadikan serbuk dengan perbandingan setiap 3750 μg FTECA setara dengan 187,50 μg EMCA; 7500 μg FTECA 375,00 μg setara dengan EMCA dan 15000 μg FTECA setara dengan 750,00 μg EMCA.

4.4 Tatalaksana Penelitian

4.4.1 Penelitian pendahuluan untuk memilih dosis

Penelitian pendahuluan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Bersama untuk menentukan dosis yang dipergunakan dalam penelitian. Dosis 4800 μg , 2400 μg , 1200 μg per 100 gram BB tikus menyebabkan perdarahan usus halus. Kemudian dosis diturunkan menjadi 600 μg per 100 gram BB tikus, tidak terjadi perdarahan. Selanjutnya dengan rumus Paget, 1964 diperoleh dosis 375,0 μg per 100 gram BB tikus (Paget, 1964).

Pada percobaan ini diambil 3 dosis. Dosis pertama yang besarnya $\frac{1}{2}$ dari dosis yang telah ditetapkan yaitu $\frac{1}{2} \times 375,0 \mu\text{g} = 187,50 \mu\text{g}$ dan dosis ketiga adalah 2 kali dosis yang telah ditetapkan yaitu $2 \times 375,0 \mu\text{g} = 750,0 \mu\text{g}$.

4.4.2 Pemeliharaan tikus

4.4.2.1 Kandang hewan coba

Setiap kotak plastik, berukuran 30 X 40 cm berisi 5 ekor tikus, dengan tujuan supaya setiap tikus leluasa bergerak, dengan demikian mencegah

timbulnya perkelahian dan stres yang dapat mempengaruhi aktivitas sel-sel imunokompeten. Selanjutnya setiap tikus diberi tanda dengan asam pikrat yang memberi warna kuning dan warna dapat bertahan cukup lama serta tidak toksis. Dengan demikian dapat dibedakan satu tikus dengan tikus lainnya. Seluruh kotak plastik yang berisi tikus diletakkan pada ruang khusus yang mempunyai alat pendingin udara dengan tujuan untuk menambah kenyamanan, kebersihan kandang tetap dipertahankan, makanan dan minumannya disesuaikan dengan kebutuhan dan di kontrol setiap hari.

4.4.2.2. Makanan hewan coba

Selama pemeliharaan, tikus mendapat makanan *Par G Pelet* produksi PT Japfa Comfeed Sidoarjo, dengan kandungan isi sebagai berikut: Protein 15-16%; lemak 4-5%; kalsium 0,9-1,1%; fosfor 0,6-0,8%; abu 5% dan enersi setiap kg = 2500-2700 Kcal (brosur PT.Comfeed Indonesia Ltd).

4.4.2.3 Minuman hewan coba

Selama pemeliharaan tikus diberi minum air bening / air PAM yang terlebih dahulu dimasak. Setelah dingin, air dimasukkan ke dalam botol kaca yang mempunyai pipa sedot dari kaca, melalui pipa ini tikus dapat menyedot atau menghisap air sesuai dengan kebutuhannya setiap waktu. Dengan demikian air minum dapat dijamin kebersihannya, bebas dari kontaminasi kotoran / tinja tikus itu sendiri.

4.4.3 Persiapan hewan uji

Secara random, setiap kotak plastik yang mempunyai tutup kawat diisi 5 ekor tikus. Semuanya berjenis kelamin jantan dengan berat 95-120 gram. Tikus dibiarkan selama 1 minggu untuk adaptasi dan bila ada tikus agresif atau luka pada setiap kotak akan segera diganti.

4.4.4 Penanganan selama pengujian

Selama pengujian tikus diberi paparan EMCA dan FTECA dalam larutan 1,5 ml garam faali dengan dosis yang telah ditetapkan untuk setiap kelompok tikus. Kelompok 1 EMCA atau FTECA mendapat paparan masing-masing 187,50 μg , kelompok 2 mendapat paparan 375,0 μg dan kelompok 3 mendapat paparan 750,0 μg per 100 gram berat badan tikus. Setiap tikus mendapat perlakuan 10 kali dengan selang waktu 10 hari untuk setiap perlakuan, sehingga keseluruhannya memerlukan 100 hari. Tiga hari setelah perlakuan terakhir, dilakukan otopsi dan kelenjar getah bening diambil dan diawetkan di dalam blok parafin untuk selanjutnya dibuat sediaan objek gelas di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD.dr.Sutomo dan Laboratorium Onkologi di Jalan Bawean no. 40 –Surabaya.

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

4.5.1 Tempat penelitian

1. Penelitian dikerjakan di tikus dipelihara di Laboratorium hewan coba

- bersama Unair.
2. Serbuk *Centella asiatica* (EMCA) disiapkan di Laboratorium Fitokimia FF. Unair dan Laboratorium Dasar Bersama Unair.
 3. Sediaan objek gelas disiapkan di Laboratorium PA RSUD.Dr.Sutomo Laboratorium Onkologi jalan Bawean no. 40 -Surabaya..
 4. Pewarnaan imunohistokimia dikerjakan di Lab. GRAMIK FK.Unair.

4.5.2 Waktu penelitian dan jadwal kegiatan

Waktu penelitian sampai pelaporan kurang lebih 36. bulan, dapat dilihat pada skema dibawah ini:

KEGIATAN	BLN 4	BLN 8	BLN 12	BLN 16	BLN 20	BLN 24	BLN 28	BLN 32	BLN 36
1. STUDI PUSTAKA	X X								
2.PERSIAPAN PROPO- SAL	X X	X							
3.PENELITIAN PENDAHULUAN	X X								
a.Persiapan bahan peneli- ttian	X X								
b.Pemesanan bahan imu- nohistokimia	X X X X	X X	X X	X X					
c.Penetapan dosis	X								
d.Persiapan tempat / kan- dang	X								
e.Persiapan tikus	X								
4.PENELITIAN									
a.Pelaksanaan penelitian			X X						
b.Pembuatan sediaan				X X					
c.Pewarnaan					X X				
d.Pembacaan sediaan						X X	X X		
e.Pngumpulan data dan analisis statistik								X X	
f.Penulisan dan publikasi									X X

Skema 4.4 Waktu pelaksanaan kegiatan

Pada skema 4.6 diatas dapat dilihat tahap demi tahap waktu penelitian serta kegiatan yang dilaksanakan.

4.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Populasi penelitian adalah tikus dari *Rattus norvegicus strain Wistar*. Setelah tikus diberi perlakuan sesuai dengan dosis yang telah ditetapkan sebanyak 10 X pemberian dengan selang waktu 10 hari, tikus dikorbankan dengan cara otopsi. Kelenjar getah bening mesenterium diambil dan diawetkan dalam larutan formalin 10%. Tikus dibagi dalam 3 kelompok EMCA dan 3 kelompok FTECA dan satu kelompok plasebo, masing-masing kelompok terdiri dari 15 ekor tikus. Kelompok 1 mendapat 187,50 μ g, kelompok 2 mendapat 375.0 μ g dan kelompok 3 mendapat 750,0 μ g per 100 gram berat badan. Kelompok terakhir adalah kontrol plasebo yang tidak mendapat perlakuan.

4.7 Pengukuran Respons Imun Parakorteks Kelenjar Getah Bening

Dari sayatan-sayatan parafin blok dibuat sediaan untuk pewarnaan imunohistokimia, dengan cara sebagai berikut: Pertama dilakukan deparafinisasi, sediaan berturut-turut dicuci dengan Xylol, alkohol PA, alkohol 95%, 80%, 70% masing-masing 2X @ 3 menit dan air, terakhir dengan PBS 5 menit. Kedua membran sel dipecah dengan meneteskan enzim tripsin dan dibiarkan selama 6 menit, kemudian dicuci dengan PBS 5 menit. Ketiga sediaan ditetesi dengan H₂O₂ 3% dan dibiarkan 5 menit, kemudian diguyur dengan PBS 2X @ 5 menit. Keempat direaksikan dengan mAb primer, supaya terjadi ikatan *reseptor-mAb primer*, dibiarkan selama 30-45 menit.

Kelima direaksikan dengan mAb sekunder, supaya terjadi *ikatan reseptor-mAb primer-mAb sekunder* selama 30-45 menit, setelah itu dicuci dengan PBS 2X @ 5 menit. Keenam ditetesi *streptavidin*, biarkan 15 menit dan dicuci kembali dengan PBS 2X @ 5 menit. ketujuh direaksikan dengan zat warna DAB yang terikat dengan biotin, sehingga terjadi reaksi akhir *ikatan reseptor-mAb primer-mAb sekunder-streptavidin- biotin DAB* yang memberi warna coklat. Selanjutnya dengan menggunakan gratikulae 0,5 mm x 0,5 mm semua sel berwarna coklat yang memenuhi persyaratan dihitung Sel-sel imunokompeten yang diperiksa adalah limfosit CD4⁺T, limfosit CD8⁺T, makrofag, limfoblas B yang mensekresi sIgA, sIgG dan sIgM serta limfosit CD4⁺T yang mensekresi IFN- γ (Mayer, and Walker, 1990).

4.8 Teknik Analisis Data

Untuk menganalisis data yang diperoleh, dilakukan langkah sebagai berikut, yaitu menggunakan uji statistik univariat, multivariat (Gasperz, 1992a; Gasperz, 1992b) dan beda fungsi diskriminan dengan metode Wilks serta menggunakan program SPSS (Paryono, 1994).

4.8.1 Uji homogenitas

Untuk membuktikan bahwa populasi sampel homogen, maka dilakukan uji homogenitas dengan uji statistik anova yang di uji adalah berat badan dan umur tikus (Gasperz, 1992b).

4.8.2 Uji normalitas

Uji normalitas variabel diperlukan sebagai syarat untuk uji analisis multivariat (manova). Data berasal dari parakorteks KGB grup perlakuan EMCA, grup kontrol FTECA dan kelompok kontrol plasebo dan yang diuji adalah ke tujuh variabel yaitu limfosit CD4⁺T, limfosit CD8⁺T, sel M \emptyset , IFN- γ , sIgA, sIgG dan sIgM (Gasperz, 1992b).

4.8.3 Uji konsistensi (reliabilitas) pengamatan

Uji konsistensi atau uji reliabilitas dilakukan pada hasil pengamatan kedua pengamat untuk melihat homogenitas hasil pengamatan dari ketujuh variabel pada grup EMCA, grup FTECA dan kontrol plasebo dengan menggunakan uji analisis manova (Gasperz, 1992b).

4.8.4 Uji perbedaan antara kelompok sampel

Uji ini untuk melihat apakah ada perubahan respons imun, setelah diberi paparan dengan EMCA, kontrol FTECA dan kontrol plasebo. Ketujuh variabel yang diuji berasal dari daerah parakorteks KGB dengan uji analisis manova, perubahan yang terjadi akibat paparan dapat diketahui (Gasperz, 1992a; Gasperz, 1992b).

4.8.5 Diskriminan

Diskriminan merupakan nilai pembeda, diperoleh dari uji manova,

untuk mengetahui apakah variabel dari grup perlakuan EMCA berbeda dengan grup kontrol plasebo dan grup kontrol FTECA. Nilai pembeda yang sebenarnya diperoleh dari perkalian nilai rerata dari hasil uji manova dengan koefisien Fisher (Gasperz, 1992a).

4.8.6 Pembuatan pola respons imun ke tujuh variabel

Dengan menggunakan uji statistik manova dan analisis diskriminan dicari pola tertentu dari ketiga grup. Berdasarkan pola ini kita dapat memprediksi aktivitas biologis apa saja yang telah terjadi yang ada kaitannya dengan konsep yang digunakan. Dengan demikian mekanisme imunomodulasi pada sistem imun kelenjar getah bening dapat terungkap.

4.8.7 Persoalan ketepatan pengukuran atau validitas pengukuran

Hasil suatu penelitian akan menggambarkan hasil yang sebenarnya, bila validitas (derajat kebenaran pengukuran) dan reliabilitas (konsistensi pengukuran internal dan eksternal) telah dilakukan dengan baik. Pada penelitian ini, persoalan ketepatan pengukuran diatasi dengan cara:

1. Sampel dibuat homogen,
2. Alat ukur yang digunakan telah ditera,
3. Faktor subyektivitas peneliti diatasi dengan membandingkan hasil pengamatan dengan pengamatan orang kedua,
4. Pewarnaan histokimia disupervisi seorang ahli,
5. Pengolahan data dengan SPSS dan disupervisi seorang ahli.

BAB 5

Bab 5

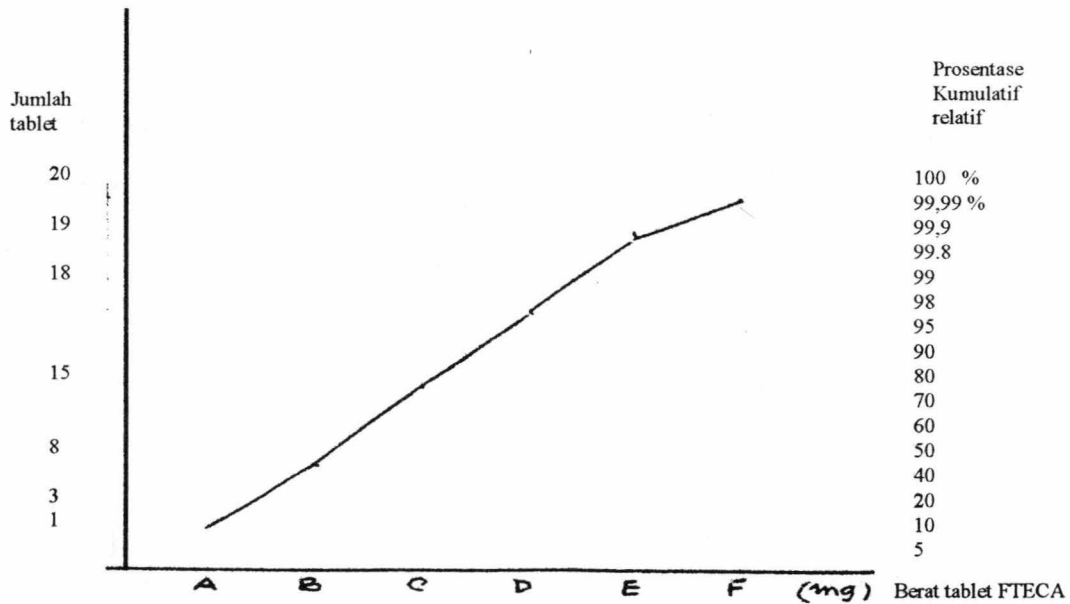
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

Di bawah ini dapat dilihat, berturut-turut grafik, tabel atau foto yang memuat semua hasil penelitian.

Gambar 5.1 dan gambar 5.2 menunjukkan tablet FTECA dan berat badan tikus berasal dari populasi homogen.

5.1.1 Grafik yang menunjukkan berat tablet dan berat badan tikus berasal dari populasi normal (gambar 5.1 dan gambar 5.2)



Gambar 5.1 Grafik yang menunjukkan berat tablet merupakan garis lurus, setelah di plot pada kertas probabilitas normal.

Grafik di atas dibuat berdasarkan kertas probabilitas normal dengan mengelompokkan berat tablet (FTECA) ke dalam prosentase kumulatif relatif, sebagai berikut:

A tablet dengan berat 0,0001 s/d 0,1975005 gram, jumlah 1 tablet (5 %)

B tablet dengan berat 0,1975006 s/d 0,2000005, jumlah 2 tablet (15%)

C tablet dengan berat 0,2000006 s/d 0,2025005, jumlah 5 tablet (40%)

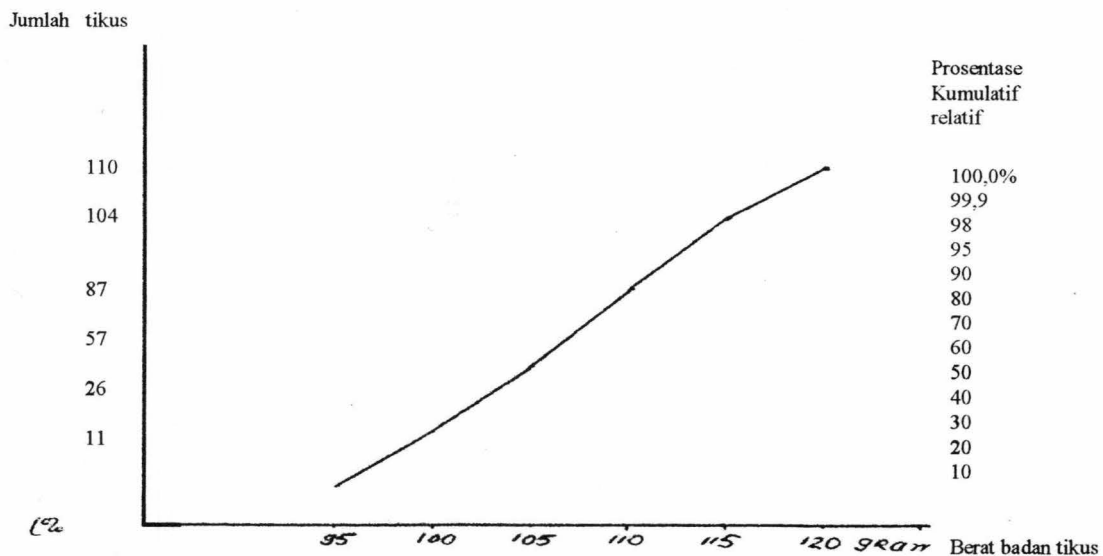
D tablet dengan berat 0,2025006 s/d 0,2050005, jumlah 7 tablet (75%)

E tablet dengan berat 0,2050006 s/d 0,2075005, jumlah 3 tablet (90%)

F tablet dengan berat 0,2075006 s/d 0,2100005, jumlah 1 tablet (95%)

G tablet dengan berat 0,2100005 s/d 0,2125005, jumlah 1 tablet (100%)

Grafik di bawah ini menunjukkan berat badan tikus pada permulaan penelitian



Gambar 5.2 Grafik yang menunjukkan berat tikus merupakan garis lurus, setelah di plot pada kertas probabilitas normal.

Grafik di atas dibuat berdasarkan kertas probabilitas normal dengan mengelompokkan jumlah tikus ke dalam prosentase kumulatif relatif, sebagai berikut:

Berat 95 gram, jumlah tikus 11, prosentase kumulatif = 10%

Berat 100 gram, jumlah tikus 15, prosentase kumulatif = 23,64 %

Berat 105 gram, jumlah tikus 31, prosentase kumulatif = 51,82%

Berat 110 gram, jumlah tikus 30, prosentase kumulatif = 79,09 %

Berat 115 gram, jumlah tikus 17, prosentase kumulatif = 94,55 %

Berat 120 gram, jumlah tikus 6, prosentase kumulatif = 100 %.

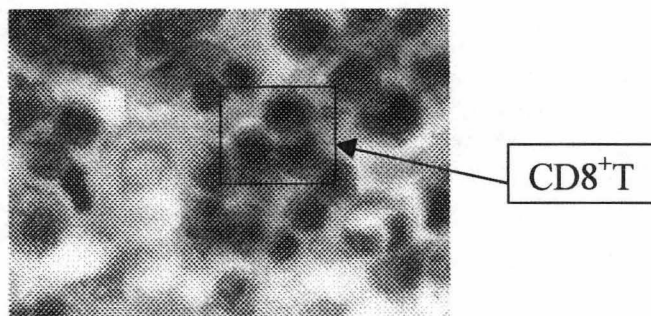
Grafik pada gambar 5.1 di atas menggambarkan garis lurus yang dibuat berdasarkan berat tablet dalam mg sebagai sumber FTECA dalam penelitian ini dan gambar 5.2 merupakan garis lurus dibuat berdasarkan berat badan tikus yang diukur dalam gram dan keduanya menggunakan lembar kertas probabilitas normal (Sudjana, 1975).

5.1.2 Pemeriksaan dengan HPLC

Pemeriksaan dengan menggunakan HPLC (*high performance liquid chromatography*) untuk ketiga bahan yaitu EMCA, FTECA dan asiaticoside hasilnya dapat dilihat pada khromatogram di lampiran 10 E. Pada khromatogram larutan asiaticoside tampak komponen asiaticoside dengan waktu retensi pada 10,177. Pada khromatogram larutan FTECA (madecassol) tampak komponen asiaticoside dengan waktu retensi 9,948 atau mendekati

waktu retensi 10,177. Pada khromatogram larutan EMCA tampak komponen asiaticoside dengan waktu retensi 9,772 atau mendekati waktu retensi 10,177.

5.1.3 Pengaruh EMCA dan FTECA pada aktivitas sel limfosit T CD8⁺, kelenjar getah bening tikus



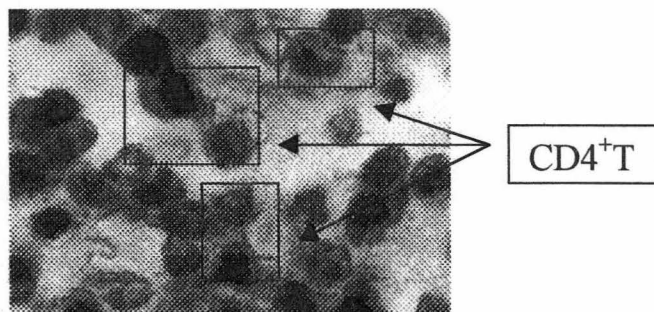
Gambar 5.3 Contoh limfosit CD8⁺T diambil dari tikus kelompok 1 yang terpapar FTECA. Kelompok EMCA tidak dicantumkan karena mempunyai gambar hampir sama dengan FTECA.

Penjelasan:

Tampak sekelompok limfosit CD8⁺T dari kelompok 1 FTECA yang berwarna coklat, setelah menyerap warna coklat, karena adanya ikatan antara ligan atau kompleks mAb dengan zat warna 3,3' diamino benzidine (DAB).



5.1.4 Pengaruh EMCA dan FTECA pada aktivitas sel limfosit CD⁺ T, kelenjar getah bening tikus.

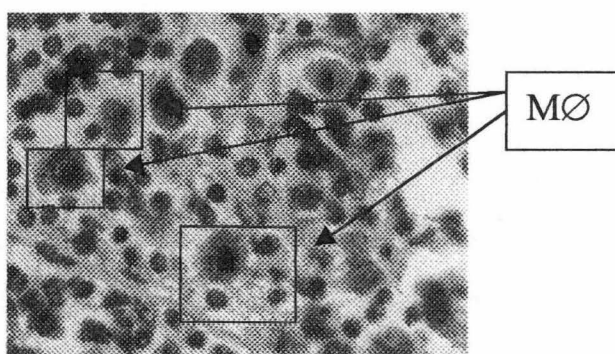


Gambar 5.4 Contoh limfosit CD⁺T dari tikus kelompok 1 grup EMCA. Kelompok FTECA tidak dicantumkan karena mempunyai gambar hampir sama dengan EMCA.

Penjelasan:

Tampak sekelompok limfosit CD⁺T dari kelompok 1 EMCA yang berwarna coklat, setelah menyerap warna coklat, karena adanya ikatan antara ligan atau kompleks mAb dengan zat warna 3,3' diamino benzidine (DAB).

5.1.5 Pengaruh EMCA dan FTECA pada aktivitas sel makrofag (MØ) kelenjar getah bening tikus.

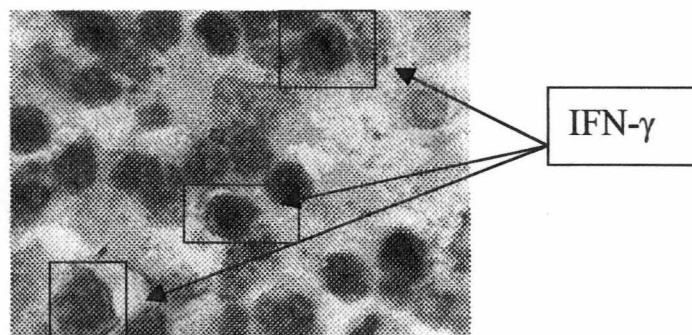


Gambar 5.5 Contoh makrofag ($M\phi$) dari tikus kelompok 3 grup FTECA. Kelompok EMCA tidak dicantumkan karena mempunyai gambar hampir sama dengan FTECA

Penjelasan:

Tampak dua sel makrofag yang berwarna coklat, setelah menyerap warna coklat, karena adanya ikatan antara ligan atau kompleks mAb dengan zat warna 3,3' diamino benzidine (DAB). Pada gambar 5.5 juga dapat dilihat limfosit $CD4^+T$ atau limfosit $CD8^+T$ yang melekat pada sel makrofag.

5.1.6 Pengaruh EMCA dan FTECA pada sel limfosit T helper 1 (Th1) yang mensekresi $IFN-\gamma$ kelenjar getah bening tikus.



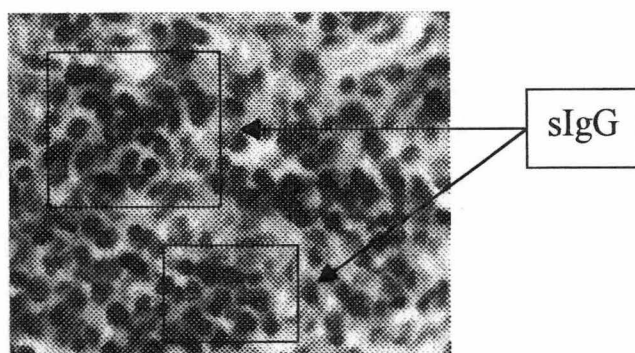
Gambar 5.6 Contoh $IFN-\gamma$ yang disekresi limfosit $CD4^+T$ (Th1) tikus kelompok 2 grup EMCA. Gambar $CD4^+T$ grup FTECA hampir sama dengan EMCA.

Penjelasan:

Pada gambar 5.6 di atas tampak limfosit $CD4^+T$ yang sedang mensekresi $IFN-\gamma$ tampak sebagai sel berwarna coklat karena telah terjadi ikatan antara ligan atau kompleks mAb dengan zat warna DAB.

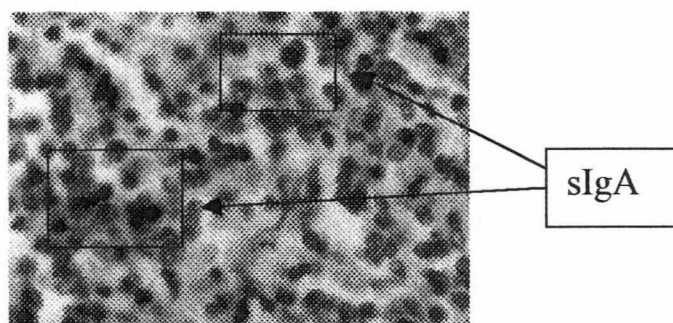
5.1.7 Pengaruh EMCA dan FTECA pada sel limfoblas B menyebabkan sekresi sIgG, sIgA dan sIgM pada kelenjar getah bening tikus.

a. Imunoglobulin G pada permukaan membran sel



Penjelasan: gambar diatas adalah limfoblas B yang mensekresi sIgG berasal dari tikus kelompok 1 grup EMCA, Warna coklat disebabkan limfoblas B telah menyerap warna coklat DAB.

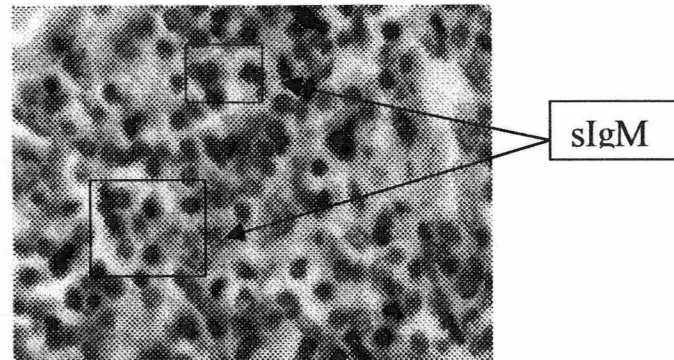
b. Imunoglobulin A pada permukaan membran sel



Penjelasan:

Gambar diatas adalah limfoblas B yang mensekresi sIgA berasal dari tikus kelompok 2 grup EMCA Warna coklat karena limfoblas B telah menyerap warna coklat dari 3,3' diamino benzidine (DAB).

C. Immunoglobulin M pada permukaan membran sel



Gambar 5.7 sIgA, sIgG disekresi oleh limfoblas B dari tikus kelompok 3 grup EMCA, sedangkan sIgM disekresi limfosit B dari grup FTECA

Penjelasan:

Gambar di atas merupakan contoh dari limfoblas B yang mensekresi sIgA berasal dari tikus kelompok 3 grup FTECA. Warna coklat disebabkan limfoblas B menyerap warna coklat DAB.

Gambar diperoleh dari mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X, selanjutnya di *scanning* untuk direkam ke dalam *hard disk*. Apabila foto akan dimasukkan ke dalam buku disertasi, maka di ambil 1/6 bagian dari foto direkam dan di pindahkan (*transfer*) setelah terlebih dahulu diperbesar 4-5 X.

5.2 Analisis Hasil Penelitian

5.2.1 Hasil uji homogenitas sampel

Uji homogenitas berat badan tikus dan berat tablet FTECA menggunakan kertas probabilitas normal. Keduanya menunjukkan distribusi normal, seperti yang terlihat pada grafik di lampiran 10 A dan lampiran 10 B.

5.2.2 Hasil uji normalitas

Hasil uji normalitas untuk semua variabel $CD4^+T$, $CD8^+T$, $M\emptyset$, $IFN-\gamma$, IgG, IgA dan IgM, juga normal berdasarkan *normal probability plot* (lihat di lampiran 10C). Uji normalitas anova untuk berat badan tikus grup perlakuan EMCA dengan grup kontrol garam faali sebagai plasebo atau kontrol negatif dan kontrol positif grup FTECA dengan grup garam faali sebagai plasebo atau kontrol negatif, dan keduanya tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. *Estimated auto-correlations* membuktikan tidak ada keraguan dalam menetapkan variabel sebagai data (lampiran 10C) dan berdasarkan *time sequence* ke empat kelompok terpisah satu dengan lain berdasarkan variabel (lampiran 10D).

5.2.3 Hasil uji keajegan / konsistensi pengamatan

Konsistensi pengamatan terhadap sediaan objek gelas oleh kedua pengamat dengan menggunakan uji keajegan atau uji konsistensi manova

dengan tingkat signifikansi telah ditetapkan yaitu sebesar 5% atau $\alpha = 0,05$.

Menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna.

Tabel 5.1 Uji homogenitas berat tikus untuk kelompok 1,2 dan 3 dari grup EMCA dan kelompok kontrol plasebo

Kel	Jml	Rerata	SB	Galat (E)	Min.	Maks	95% cont	Int. for mean
1	15	108.0000	7.7460	2.0000	95.0000	120.0000	103.7104 to	112.2896
2	15	106.0000	6.3246	1.6330	95.0000	115.0000	102.4876 to	109.5024
3	15	109.0000	5.7321	1.4800	100.0000	120.0000	105.8257 to	112.1743
ktrl	15	106.3333	4.6058	2.2408	100.0000	115.0000	103.6720 to	108.9947
Ttl	60	107.3333	6.2073	.8014	95.0000	120.0000	105.7298 to	108.9947

Fixed Effects Model 6.2440 .8061 105.7185 to 108.9482

Random Effects Model .8061 104.7680 to 109.8987

Random Effects Model-Estimate of Between Component Variance 1.7897

Tests for Homogeneity of variance

Cochrans C = Max. variance / sum (variance) = .3847, P = .234 (approx.)

Bartlett-Bax F = 1.079, P= .357

Max.variance / Min. variance 2.598

Dari tabel 5.1 di atas terlihat bahwa maksimum varians dari hasil tes homogenitas Cochrans C dan Bartlett-Bax F $\rightarrow p >$ dari 0,05. Berarti berat badan seluruh sampel tikus dari grup EMCA homogen (Lampiran 4).

Tabel 5.2 Uji homogenitas berat tikus untuk kelompok 1,2 dan 3 grup FTECA, dan kelompok kontrol plasebo

Kel	Jml	Rerata	SB	Galat (E)	Min.	Maks	95% cont	Int. for mean
1	15	105.6667	7.2866	1.8814	95.0000	120.0000	101.6315 to	109.7019
2	15	105.0000	6.5465	1.6903	95.0000	115.0000	101.3745 to	108.6254
3	15	110.0000	7.0711	1.8257	95.0000	120.0000	106.0842 to	113.9158
ktrl	15	108.0000	7.7460	2.0000	95.0000	120.0000	103.7104 to	112.2896
Tot	60	107.1667	7.2700	.9386	95.0000	120.0000	195.2886 to	109.0447

Fixed Effects Model	7.1755	.9264	105.3110 to	109.0224
Random Effects Model	1.1426		103.5304 to	110.8029
Random Effects Model-Estimate of Between Component Variance	1.7897			

Tests for Homogeneity of variance

Cochrans C = Max. variance / sum (variance) = .2913, P = 1.000 (approx.)

Bartlett-Bax F = .132, P = .941

Max.variance / Min. variance 1.400

Dari tabel 5.2, hasil tes homogenitas dari Cochrans C maupun Bartlett-Bax F, menunjukkan $\rightarrow p > 0,05$. Berarti berat badan tikus dari grup FTECA homogen (Lampiran 4).

5.2.4 Hasil uji perbedaan kedua pengamatan pada sampel kelompok grup EMCA dan grup FTECA

Tabel 5.3 di bawah ini memuat hasil pengamatan kedua pengamat untuk grup perlakuan EMCA daerah parakorteks KGB, tetapi dalam lingkup kelompok yaitu kelompok 1, kelompok 2 dan kelompok 3.

Tabel 5.3 Rerata dan simpang baku 7 variabel EMCA daerah parakorteks dibaca oleh peneliti dan pendamping

PENGAMAT	VARIABLE	Kelompok 1		Kelompok 2		Kelompok 3		KONTROL	
		Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB
PENE-LITI	IgA	11.000	2.667	31.100	19.530	12.900	2.234	2.200	3.645
	IgG	8.200	3.120	16.700	10.975	13.100	2.961	3.200	4.662
	IgM	7.200	1.687	12.000	5.011	12.200	1.687	2.400	3.658
	T CD4	11.100	2.807	13.000	5.696	5.700	1.947	1.000	1.054
	T CD8	28.600	13.492	42.500	14.544	23.600	8.618	46.400	24.263
	MØ	28.900	5.043	31.600	4.624	26.100	2.767	16.100	4.581
	IFN- γ	12.400	4.222	9.300	4.739	13.500	7.878	8.700	12.517
PEN-DAM-PING	IgA	10.700	2.359	30.100	20.273	10.200	3.259	2.200	3.882
	IgG	7.300	2.983	28.800	18.582	12.300	4.398	3.200	4.662
	IgM	7.100	1.969	13.300	5.579	11.500	2.273	2.200	3.645
	T CD4	11.000	3.464	12.900	6.773	5.500	2.273	1.000	1.247
	T CD8	27.800	13.742	41.800	14.274	23.500	8.797	46.100	24.736
	MØ	28.700	5.208	32.100	4.864	25.900	3.213	15.900	4.654
	IFN- γ	12.400	5.060	8.900	5.131	13.400	8.343	8.500	13.109

Kelompok 1 mendapat dosis 187,50 μg ; kelompok 2 dengan dosis 375 μg dan kelompok 3 dengan dosis 750 μg per 100 gram berat badan tikus.

Hasil analisis multivariat dengan metode Wilks untuk hasil pengamatan kedua pengamat adalah tidak bermakna dengan taraf kemaknaan atau sig. of F 0,920 berarti tidak ada perbedaan pengamatan antara peneliti dan pendamping, karena penelitian ini menggunakan $\alpha = 0,05$ atau taraf kepercayaan (*confidence level* 95%). Analisis univariat juga tidak menunjukkan beda bermakna, kecuali untuk IgG dengan taraf kemaknaan 0,04 atau $< 0,05$ (lampiran 5). Untuk tujuan yang sama tabel 5.4 memuat nilai rerata dan simpang baku untuk grup kontrol positif FTECA

Tabel 5.4 Rerata dan simpang baku 7 variabel pada perlakuan FTECA daerah parakorteks dibaca oleh peneliti dan pendamping

PENGA- MAT	VARIA- BEL	Kelompok 1		Kelompok 2		Kelompok 3		KONTROL	
		Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB
PENE- LITI	IgA	12.800	2.440	32.700	5.250	8.400	4.142	2.200	3.645
	IgG	13.400	1.955	40.600	9.301	6.100	2.331	3.200	4.662
	IgM	12.500	3.100	23.500	3.136	7.0	3.018	2.400	3.658
	T CD4	15.300	13.475	6.100	2.424	2.900	3.985	1.000	1.054
	T CD8	153.500	52.960	102.200	54.997	64.900	25.796	46.400	24.263
	MØ	37.900	10.005	21.900	2.923	17.100	4.818	16.100	4.581
	IFN- γ	7.800	2.530	7.000	6.912	23.400	9.343	8.700	12.517
PEN- DAM- PING	IgA	12.800	2.251	32.300	5.794	8.100	4.228	2.200	3.882
	IgG	13.200	2.201	40.300	9.105	5.800	2.486	3.200	4.662
	IgM	12.400	2.914	23.000	2.981	6.700	3.234	2.200	3.645
	T CD4	15.100	13.691	6.200	2.898	2.400	4.195	1.000	1.247
	T CD8	152.500	52.590	101.300	54.125	64.700	25.880	46.100	24.736
	MØ	38.0	10.252	22.100	3.414	18.500	6.364	15.900	4.654
	IFN- γ	7.700	3.057	6.800	7.068	23.100	8.266	8.500	13.109

Hasil analisis multivariat dengan metode Wilks untuk pengamatan semua variabel yang berasal dari sampel grup FTECA oleh peneliti dan

pendamping diperoleh taraf kemaknaan atau sig. of $F = 1.000$. berarti tidak ada perbedaan hasil pengamatan peneliti maupun pendamping. Analisis univariat untuk variabel yang sama, juga tidak menunjukkan adanya beda yang bermakna (lampiran 6). Selanjutnya data yang diperoleh dari hasil pengamatan peneliti saja yang akan diuji yaitu harga rerata semua variabel grup EMCA dalam lampiran 5 dan harga rerata semua variabel grup FTECA dalam lampiran 6 yang merupakan hasil bacaan peneliti.

Semua data yang akan diolah berasal dari daerah parakorteks kelenjar getah bening tikus. Pilihan pada data daerah parakorteks berdasarkan pertimbangan bahwa semua sel imunokompeten yang teraktivasi dan terdapat pada folikel sekunder / senter jerminal akan melalui daerah parakorteks sebelum masuk ke dalam saluran limfe eferen, duktus torasikus, vena cava inferior, jantung dan selanjutnya untuk disebarakan ke seluruh tubuh. Data hasil pengamatan peneliti dari tabel 5.3 untuk kelompok perlakuan EMCA dan dari tabel 5.4 untuk kelompok kontrol FTECA berturut-turut dibandingkan dengan data dari kelompok kontrol plasebo dan diperoleh hasil analisis seperti dibawah ini:

5.2.4 Perubahan 7 variabel daerah parakorteks setelah terpapar EMCA dan dibandingkan dengan kontrol plasebo

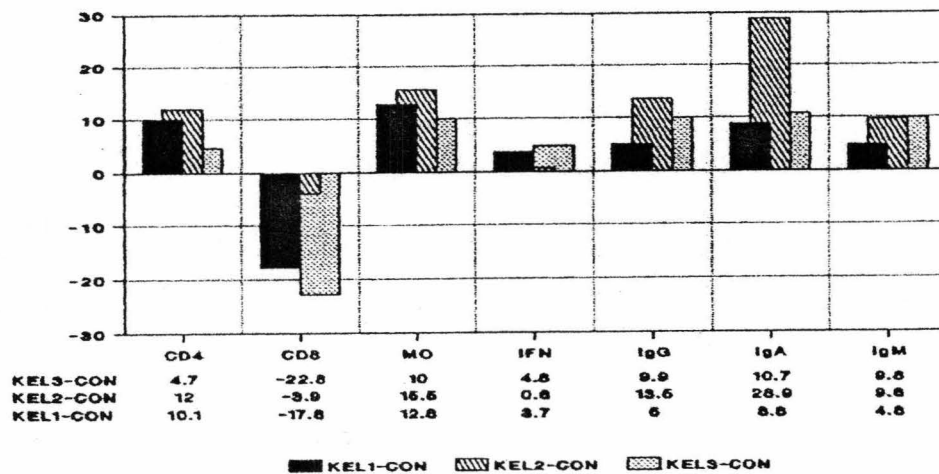
Membandingkan perubahan aktivitas 7 variabel daerah parakorteks setelah terpapar EMCA dengan ke 7 variabel yang sama karena paparan garam faali. Hasil analisis multivariat, menunjukkan adanya perbedaan yang

bermakna untuk ketiga kelompok tikus yang terpapar EMCA bila dibandingkan dengan kelompok plasebo yang terpapar dengan larutan garam faali, dengan taraf kemaknaan atau sig. of F sebesar 0,000. Analisis univariat, menunjukkan beda yang bermakna untuk 6 variabel, yaitu CD4⁺T, MØ, slgG, slgA, slgM dengan taraf kemaknaan atau sig. of F sebesar 0,000 dan untuk variabel CD8⁺T diperoleh beda bermakna dengan sig. of F sebesar 0,009. Sedangkan untuk variabel IFN- γ tidak ada perbedaan yang bermakna, karena sig of F adalah 0,479. Berarti melebihi nilai α yang telah ditetapkan, yaitu 0,05 atau taraf kepercayaan 95% (lampiran 7). Analisis multivariat dan analisis univariat ini menunjukkan bahwa paparan EMCA menyebabkan peningkatan aktivitas respons imun seluler maupun respons imun humoral yang besarnya melebihi peningkatan aktivitas respons imun karena paparan dengan larutan garam faali dan sekaligus membuktikan bahwa hipotesis pertama benar. Hasil perhitungan diperoleh nilai rerata dan simpang baku seperti yang terdapat dalam tabel 5.5 di bawah ini:

Tabel 5.5 Harga rerata dan simpang baku 7 variabel grup EMCA, dibandingkan dengan kontrol plasebo daerah parakorteks

PENELITI	VARIABEL	Kelompok 1		Kelompok 2		Kelompok 2		KONTROL	
		Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB
EMCA	IgA	11.0	2.667	31.100	19.530	12.900	2.234	2.200	3.645
	IgG	8.200	3.120	16.700	10.975	13.100	2.961	3.200	4.662
	IgM	7.200	1.687	12.0	5.011	12.200	1.687	2.400	3.658
	T CD4	11.100	2.807	13.0	5.696	5.700	1.947	1.0	1.054
	T CD8	28.600	13.492	42.500	14.544	23.600	8.618	46.400	24.263
	MØ	28.900	5.043	31.600	4.624	26.100	2.767	16.100	4.581
	IFN- γ	12.400	4.222	9.300	4.739	13.500	7.878	8.700	12.517

Jika dibuat suatu grafik berdasarkan selisih harga rerata (delta) grup EMCA dengan kelompok plasebo dari ke tujuh varaibel yang diukur akan diperoleh grafik pada gambar 5.8 di bawah ini. Grafik ini memperlihatkan bahwa aktivitas 6 variabel kelompok 2 grup EMCA lebih besar, bila dibandingkan dengan aktivitas 6 variabel dari kelompok 1 dan paling kecil adalah aktivitas variabel dari kelompok 3. Pengecualian terjadi pada variabel limfosit CD8⁺T dari kelompok 3 yang mengalami supresi paling besar kemudian diikuti limfosit CD8⁺T kelompok 1 dan yang paling kecil terjadi pada limfosit CD8⁺T kelompok 3.



Gambar 5.8 Grafik rerata dari 7 variabel dari kelompok 1,2 dan 3 grup EMCA dan kontrol plasebo daerah parakorteks.

5.2.5 Perubahan 7 variabel daerah parakorteks setelah terpapar FTECA dan dibandingkan dengan kontrol plasebo

Membandingkan nilai rerata dan simpang baku dari ke 7 variabel

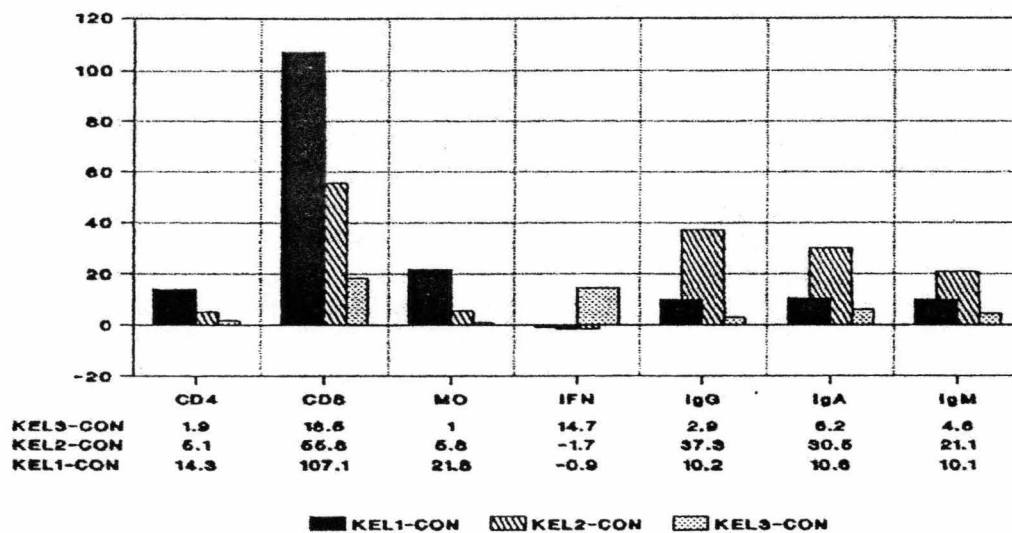
daerah parakorteks KGB tikus setelah terpapar FTECA dengan nilai rerata dan simpang baku dari 7 variabel yang sama setelah terpapar dengan garam faali, seperti yang dapat dilihat pada tabel 5.6 dan perhitungan yang lebih rinci dapat dilihat dalam lampiran 8.

Tabel 5.6 Harga rerata dan simpang baku 7 variabel grup FTECA, dibandingkan dengan kontrol plasebo daerah parakorteks

PENE- LITI	VARIA BEL	Kelompok . 1		Kelompok . 2		Kelompok . 3		KONTROL	
		Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB	Rerata	SB
FTECA	IgA	12.800	2.440	32.700	5.250	8.400	4.142	2.200	3.645
	IgG	13.400	1.955	40.500	9.301	6.100	2.331	3.200	4.662
	IgM	12.500	3.100	23.500	3.136	7.000	3.018	2.400	3.658
	T CD4	15.300	13.475	6.100	2.424	2.900	3.985	1.000	1.054
	T CD8	153.500	52.960	102.200	54.997	64.900	25.796	46.400	24.263
	MØ	37.900	10.005	21.900	2.923	17.100	4.818	16.100	4.581
	IFN- γ	7.800	2.530	7.000	6.912	23.400	8.343	8.700	12.517

Analisis yang dilakukan bertujuan untuk menjawab hipotesis kedua yang menyatakan bahwa ada perbedaan bermakna antara peningkatan aktivitas respons imun seluler dan humoral daerah parakorteks tikus, setelah terpapar FTECA bila dibandingkan dengan kelompok plasebo. Hasil analisis multivariat dengan metode Wilks membuktikan ada perbedaan yang bermakna antara grup tikus yang terpapar FTECA dengan kelompok tikus yang mengalami paparan dengan larutan garam faali. Besarnya taraf kemaknaan atau sig. of F adalah 0,000. Analisis univariat menunjukkan beda bermakna untuk variabel CD4⁺T, CD8⁺T MØ, slgG, slgA, slgM dan IFN- γ dengan taraf kemaknaan atau sig. of F sebesar 0,000.

Jika selisih nilai rerata atau delta ke tujuh variabel grup FTECA dengan kelompok plasebo yaitu limfosit CD4⁺T, limfosit CD8⁺T, MØ, IFN- γ , sIgA, sIgG dan sIgM dari kelompok 1, 2 dan 3 grup FTECA dibuat suatu grafik rerata dari grup FTECA (gambar 5.9) akan diperoleh gambaran grafik sebagai berikut:



Gambar 5.9 Grafik rerata dari 7 variabel dari kelompok 1,2 dan 3 grup FTECA dan kontrol plasebo daerah parakorteks.

5.2.7 Peningkatan respons imun karena paparan EMCA dengan dosis yang berbeda

Untuk membuktikan hipotesis ketiga yang mengatakan bahwa besarnya dosis perlakuan EMCA yaitu 187,50 μg ; 375,0 μg dan 750,0 μg mempengaruhi perbedaan besarnya respons imun yang ditimbulkannya.

Hasil pembuktian dapat dilihat pada tabel 5.5. Hasil analisis multivariat dengan metode Wilks menunjukkan bahwa ketiga kelompok grup EMCA dan kelompok kontrol berbeda satu dengan lainnya dengan taraf kemaknaan atau sig of F sebesar 0,000. Hasil uji univariat menunjukkan bahwa, kelompok 1 grup EMCA berbeda dengan kelompok 3 dengan taraf kemaknaan 0,000. Kelompok 2 berbeda dengan kelompok 3 dengan taraf kemaknaan 0,000. Jika penilaian ditujukan pada setiap variabel yang diuji, maka diperoleh hasil sebagai berikut:

Variabel $CD4^+T$, $M\emptyset$, sIgG, sIgA dan sIgM berbeda satu dengan lainnya dengan taraf kemaknaan atau sig of F sebesar 0,000. Variabel $CD8^+T$ berbeda dengan taraf kemaknaan sebesar 0,009. Variabel IFN- γ dari ketiga kelompok grup EMCA tidak menunjukkan perbedaan bermakna, karena taraf kemaknaan hanya sebesar 0,479. Secara keseluruhan telah terbukti bahwa ke tujuh variabel dari kelompok 1,2 dan 3 grup EMCA menunjukkan perbedaan bermakna satu dengan lainnya. Lihat lampiran 7.

5.2.8 Diskriminan untuk identifikasi variabel pembeda

Rekapitulasi dari semua hasil analisis multivariat untuk ke tujuh variabel di daerah parakorteks setelah terpapar EMCA, dan setelah melalui 7 tahap analisis menunjukkan hasil seperti yang dapat dilihat pada *summary table* di lampiran 7 serta dapat diringkas seperti di bawah ini:

Tabel 5.7 Rekapitulasi 7 variabel di daerah parakorteks setelah perlakuan dengan EMCA

Action		Variance	Wilks	Significance
Step	Entered removed	In	Labda	Sig.
1	CD4 ⁺ T	1	0,31492	0,000
2	IgM	2	0,14603	0,000
3	MØ	3	0,10920	0,000
4	CD8 ⁺ T	4	0,06797	0,000
5	IgA	5	0,05061	0,000
6	IFN- γ	6	0,04658	0,000

Pada tabel 5.7 di atas terlihat bahwa 6 variabel di dalam grup EMCA menjadi variabel pembeda dengan taraf signifikansi yang sangat bermakna yaitu 0,000 kecuali sIgG yang tidak termasuk sebagai variabel pembeda. Sedangkan rekapitulasi dari semua hasil analisis multivariat untuk ke tujuh variabel yang terdapat di daerah parakorteks setelah terpapar FTECA, dan setelah melalui 7 tahap analisis menunjukkan hasil seperti yang dapat dilihat pada *summary table* pada lampiran 8 serta yang dapat diringkas seperti tabel 5.8 di bawah ini:

Tabel 5.8 Rekapitulasi 7 variabel di daerah parakorteks setelah perlakuan dengan FTECA

Action		Variance	Wilks	Significance
Step	Entered removed	In	Lambda	Sig.
1	IgA	1	0,09938	0,000
2	IgG	2	0,06171	0,000
3	IgM	3	0,04277	0,000
4	CD8 ⁺ T	4	0,02014	0,000
5	MØ	5	0,01006	0,000
6	CD4 ⁺ T	6	0,00615	0,000
7	IFN- γ	7	0,00405	0,000

Untuk grup tikus yang terpapar FTECA sebagai kontrol positif, hasil analisis multivariat ke tujuh variabel menunjukkan beda yang bermakna dengan taraf kemaknaan atau sig. of F sebesar 0,0000 sehingga semua variabel di grup FTECA menjadi variabel pembeda.

5.2.9 Pembuatan pola perubahan respons imun

Model atau pola bertujuan untuk memecahkan suatu masalah atau untuk memberi penjelasan bagaimana perubahan respons imun imunopatobiologik terjadi pada grup tikus yang terpapar EMCA dan grup tikus yang terpapar dengan garam faali sebagai grup kontrol plasebo. Nilai setiap variabel yang membentuk pola diperoleh dengan mengalikan koefisien Fisher pada tabel 5.9 di bawah ini yang diperoleh dari (*Fisher's Linear discriminant function*) dengan nilai yang diperoleh dari data asli seperti yang tercantum di dalam lampiran 3 D.

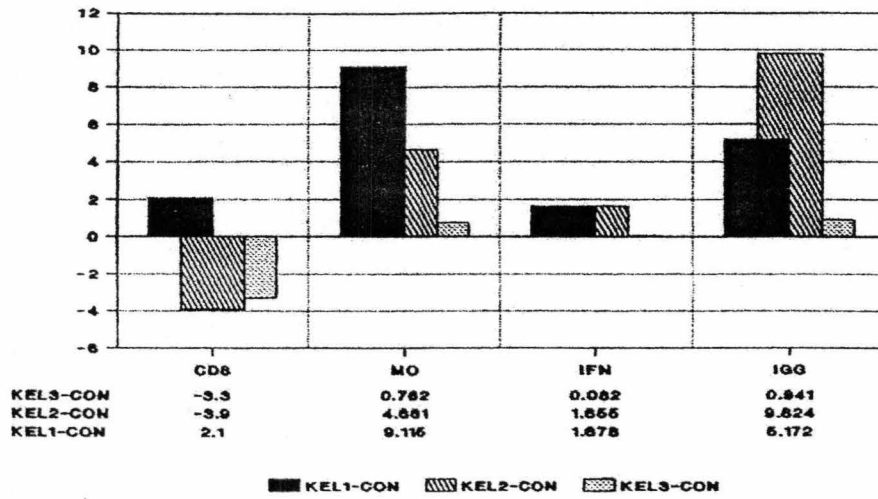
Tabel 5.9 Koefisien Fisher dari grup EMCA

Kelompok	1 187,50 µg	2 375,0 µg	3 750 µg	4 Kontrol
CD4 ⁺ T	0,1623820	-0,1092221E-01	-0,5522419	-0,8257150
CD8 ⁺ T	-0,1200711E-01	0,1169946	0,9204994E-01	0,2153181
MØ	1,763554	1,658778	1,686898	0,9706378
IFN-γ	0,3303365	0,2614804	0,3466370	0,2124421
IgA	-0,1556872	0,4389256E-01	-0,1034147	-0,8601994E-01
IgM	0,8322910	1,480283	1,508509	0,8048924
(constant)	-0,31,78722	-40,79024	-33,78729	-15,57782

Dengan bantuan analisis diskriminan diperoleh pola yang dibentuk oleh aktivitas ketujuh variabel dari kelompok 1,2 dan 3 grup EMCA. Pada gambar 5.10 di bawah ini, terlihat bahwa ketiga pola respons imun kelompok 1,2 dan 3 grup EMCA berbeda satu dengan lainnya. Pola respons imun kelompok 1 terdiri dari 4 variabel sebagai variabel pembeda yang semuanya mengalami peningkatan yaitu variabel $CD8^{+}T$, $M\emptyset$, $IFN-\gamma$ dan $slgG$. Pola respons imun kelompok 2 terdiri dari 4 variabel pembeda $M\emptyset$, $IFN-\gamma$ dan $slgG$ yang mengalami peningkatan disertai dengan variabel $CD8^{+}T$ yang mengalami supresi. Pola respons imun kelompok 3 terdiri dari 4 variabel pembeda yang menonjol adalah adanya peningkatan variabel $M\emptyset$ dan $slgG$, sedangkan variabel $IFN-\gamma$ meningkat sangat sedikit atau hampir mendekati nol disertai penurunan variabel $CD8^{+}T$ sehingga menjadi negatif karena supresi.

Pola respons imun dari ketiga kelompok grup EMCA, terbentuk karena perubahan respons imun daerah parakorteks kelenjar getah bening setelah terpapar EMCA dengan dosis berbeda yaitu 187,50 μg untuk kelompok 1; 375,0 μg untuk kelompok 2 dan 750,0 μg per 100 gram berat badan tikus untuk kelompok 3.

Dengan demikian hipotesis ke empat yang mengatakan ketiga kelompok grup EMCA mempunyai pola yang berbeda telah terbukti.



Gambar 5.10 Grafik pola dari selisih perbedaan respons imun patobiologik dari variabel daerah parakorteks EMCA

BAB 6

Bab 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan

Penelitian ini, merupakan upaya mencari obat pendukung atau obat suportif yang berasal dari tanaman berkhasiat obat. Bagi individu yang mengkonsumsi tanaman ini secara teratur diharapkan akan meningkatkan daya tahan tubuh melalui peningkatan respons imun seluler dan respons imun humoral. Seorang individu yang menderita penyakit khronis yang disertai penurunan daya tahan tubuh, pemberian obat yang berasal dari tanaman berkhasiat obat ini diharapkan dapat memperbaiki sistem imun tubuh.

Gabungan khemoterapi dan obat yang berasal dari tanaman obat diharapkan mampu memperbaiki kesehatan penderita dengan lebih baik. Sebagai contoh, seorang penderita penyakit tuberkulosis paru yang mengalami infeksi khronis, proses penyembuhan dapat berlangsung melalui 2 jalur pengobatan. Pertama melalui aktivitas khemoterapi yang bersifat bakteriosidik seperti INH, rifampisin, pirazinamide dan aktivitas bakteriostatik dari etambutol (Winstanley, 1994). Kedua melalui peningkatan respons imun intraseluler dan ekstraseluler yang dipicu larutan EMCA, karena hasil penelitian membuktikan bahwa larutan EMCA dapat meningkatkan respons imun tikus melalui aktivitas $CD4^+T$, $M\emptyset$ serta sekresi $IFN-\gamma$ oleh $CD4^+T$. Limfosit $CD4^+T$ subset Th1 dan limfosit $CD8^+T$ subset Tc1 yang aktif akan mensekresi $IFN-\gamma$ dan IL-2. Interleukin-2 secara otokrin dapat meningkatkan

aktivitas dirinya sendiri, secara parakrin dapat meningkatkan aktivitas limfosit CD4⁺T dan limfosit CD8⁺T di dekatnya, secara jukstakrin akan meningkatkan aktivitas limfosit di sekitarnya dan secara endokrin akan mengaktifkan limfosit yang letaknya lebih jauh. Aktivitas CD4⁺T dan CD8⁺T akan bertambah kuat, apabila makrofag mengeluarkan IL-12 (Parslow,1997). Sedangkan interferon-gama atau IFN- γ yang dihasilkan CD4⁺T dan CD8⁺T meningkatkan aktivitas sel fagosit, terutama makrofag sehingga menambah kemampuan menghancurkan mikroorganisme penyebab infeksi dengan lebih baik (Parslow, 1997). Kemampuan lain dari IFN- γ adalah memicu sel-sel yang berada disekitar sel target untuk meningkatkan pertahanan diri, melalui produksi sejenis protein yang mampu mencegah infeksi virus. Selain dari itu aktivitas fagositosis makrofag akan lebih kuat dan efektif bila dibantu antibodi melalui proses opsonisasi (Peakman, 1997). Antibodi ini adalah molekul glikoprotein yang disekresi limfoblas B atau plasma sel setelah terlebih dahulu diaktifkan IL-4 dan IL-5 yaitu sitokin yang dihasilkan limfosit CD4⁺T subset Th2 dan limfosit CD8⁺T subset Tc2 (Peakman,1997).

Penelitian ini juga ingin mengungkap mekanisme yang dipergunakan EMCA pada saat membangkitkan respons imun seluler dan humoral pada hospes. Agar hasil penelitian ini dapat disimpulkan, maka peneliti menggunakan paradigma psikoneuroimunologis yang berkonsep pada imunomodulator ajuvan sebagai dasar untuk menjelaskan peristiwa yang terjadi.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *The post test only control group design*, karena semua data diperoleh dari sampel (tikus) yang dikorbankan lebih dahulu. Selanjutnya untuk memastikan bahwa data yang diperoleh betul-betul valid dan sah, maka validitas eksternal harus dijaga sebaik-baiknya, yaitu dengan melakukan randomisasi sampel acak sistematis dan membuat sampel sehomogen mungkin. Untuk ini dilakukan beberapa uji pendahuluan seperti uji homogenitas, uji normalitas dan uji konsistensi. Untuk mengetahui sampel homogen, dilakukan uji statistik manova dan untuk mengetahui sampel berasal dari populasi normal dilakukan uji normalitas. Ternyata kedua uji di atas membuktikan bahwa tikus berasal dari populasi homogen serta berdistribusi normal. Sehingga besar atau kecilnya variabel yang terukur, hanya tergantung dari perbedaan besar-kecilnya dosis perlakuan serta perbedaan bahan perlakuan yang diberikan, yaitu apakah EMCA atau FTECA.

Dosis yang diberikan pada grup perlakuan dan grup kontrol positif sama besar, yaitu kelompok 1 grup EMCA dan kelompok 1 grup FTECA diberi bahan perlakuan dengan dosis 187,50 μg ; Kelompok 2 grup EMCA dan kelompok 2 grup FTECA diberi dosis 375,0 μg dan untuk kelompok 3 grup EMCA dan kelompok 3 grup FTECA mendapat dosis 750,0 μg per 100 gram berat badan tikus

Akhirnya untuk membuktikan bahwa larutan EMCA dan larutan FTECA dapat meningkatkan respons imun seluler dan respons imun humoral,

seluruh data diolah dengan menggunakan uji statistik multivariat atau manova dan uji statistik analisis univariat atau anova (Gasperz, 1992b)

Untuk memecahkan suatu masalah, dalam penerapannya paradigma yang dipergunakan perlu dijabarkan ke dalam suatu bentuk kerangka berpikir atau konsep. Konsep psikoneuroimunologis didasarkan pada suatu pengaturan atau modulasi terhadap aktivitas sistem imun yang ditimbulkan ajuvan. Dengan demikian fungsinya dinamakan imunomodulator ajuvan. Menurut Playfair, 1992 ajuvan adalah suatu bahan atau materi yang dapat meningkatkan respons imun, bila diberikan bersamaan dengan antigen dan kerjanya lebih bersifat memperpanjang waktu presentasi antigen oleh makrofag atau limfosit B atau sel APC lainnya kepada limfosit CD4⁺T atau limfosit CD8⁺T (Playfair, 1992).

Paul Katz, 1993 membuat definisi mengenai imunomodulasi yaitu sebagai suatu pengaturan menyeluruh respons imun yang meliputi imunopotensiasi atau *up-regulation* dan imunosupresi *down-regulation*. Imunopotensiasi ada kaitannya dengan respons imun spesifik maupun respons imun non-spesifik. Dengan demikian suatu potensiator dapat menambah peristiwa imunologik dengan cara, pertama memendekkan periode laten supaya respons menjadi nyata, kedua memperbesar kadar respons imun tertentu secara menyeluruh, ketiga memperpanjang masa respons, keempat memperlambat penghentian respons dan kelima mengembangkan respons baru terhadap antigen yang sebelumnya tidak merangsang (Katz, 1993). Sebagai contoh Playfair, 1992 mengemukakan

beberapa bahan antara lain *oil emulsion*, garam logam [seperti $\text{Al}(\text{OH}_3)$], vesikel sintetik lipid (*liposom*), atom-atom saponin yang membentuk kisi-kisi (*lattices of saponin*) dan *complete Freud's adjuvant* (CFA), muramil peptida yang berasal dari dinding sel *M.tuberculosis* dan bahan atau komponen saponin yang berasal dari tumbuhan (Playfair, 1992). Kensil, 1998 membuktikan bahwa ekstrak QS-21 yang berasal dari kulit tanaman *Quillaja saponaria* merupakan suatu ajuvan murni bersifat imunologik. Ekstrak QS-21 merupakan senyawa glikosida triterpen yang larut dalam air dan dapat bercampur dengan *soluble antigen* membentuk emulsi atau garam mineral. QS-21 meningkatkan sekresi antibodi dan respons CMI pada subunit antigen, misalnya DNA vaksin (Kensil, 1998b).

Kelenjar getah bening mesenterium dipilih sebagai objek penelitian, pertama karena kelenjar getah bening mesenterium merupakan jaringan limfoid kedua yang berfungsi mempertahankan homeostasis tubuh terhadap antigen yang masuk melalui oral, sedangkan jaringan limfoid Peyer's patches merupakan benteng pertahanan tubuh pertama (Ogra, 1994). Kedua untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada sistem imun, apabila tubuh terpapar dengan ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA) atau fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* (FTECA). Ketiga untuk mengetahui apakah paparan EMCA pada kelenjar getah bening mesenterium dapat meningkatkan aktivitas limfosit $\text{CD4}^+\text{T}$ subset Th1, Th2 dan aktivitas limfosit $\text{CD8}^+\text{T}$ subset Tc1, Tc2. Karena peningkatan aktivitas limfosit $\text{CD4}^+\text{T}$ subset Th1 dan Th2 dapat memperbaiki daya tahan tubuh individu yang berguna untuk

menghadapi penyakit infeksi. Pada penyakit khronis seperti tuberkulosis paru yang ditandai dengan menurunnya jumlah rasio limfosit CD4⁺T bila dibandingkan dengan limfosit CD8⁺T (Beck, 1985), maka pemberian obat yang dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas CD4⁺T dibandingkan dengan jumlah CD8⁺T sangat diharapkan. Peneliti lain membuktikan bahwa, CD8⁺T lebih dominan daripada CD4⁺T terutama pada permulaan fase akut. Infeksi *M.tuberculosis* menyebabkan CD4⁺T berdiferensiasi ke dalam 4 subset populasi, yang masing-masing subset menandai fase yang terjadi pada infeksi TB. Keempat subset CD4⁺T ini, ditentukan berdasarkan marker pada permukaan sel yang diekspresikannya. Fase permulaan ditandai dengan meningkatnya subset CD4⁺T yang ditandai dengan marker CD44^{lo}CD45RB^{lo} terdapat pada limfosit T naïve. Fase kedua atau fase protektif, ditandai dengan jumlah populasi subset CD4⁺T dengan marker CD44^{hi}CD45RB^{hi} meningkat. Pada fase tiga terjadi peningkatan DTH ditandai dengan peningkatan jumlah populasi subset CD4⁺T dengan marker CD44^{hi}CD45RB^{lo/neg} dan fase empat ditandai dengan terjadinya sitolisis dan terbentuknya sel memori spesifik terhadap peptida *M.tuberculosis*. Pada fase empat populasi subset CD4⁺T mengekspresikan marker permukaan sel CD44^{hi}CD45RB^{neg} (Orme, 1987; Griffin, 1994).

Meeusen, 1996 telah membuktikan bahwa bila jaringan limfoid Peyer's patches terpapar dengan antigen poliklonal, akan terjadi peningkatan aktivitas Th2 lebih dominan dibandingkan dengan peningkatan aktivitas Th1. Sebaliknya pada kelenjar getah bening perifer yang terpapar antigen poliklonal

terjadi peningkatan aktivitas Th1 yang lebih besar dibandingkan dengan aktivitas Th2 (Meeusen, 1996). Berdasarkan pernyataan tersebut, perlu pula dibuktikan apakah KGB mesenterium termasuk dalam katagori KGB periferi, sebab KGB mesenterium merupakan KGB perifer yang paling dekat jaraknya dengan Peyer's patches dibandingkan dengan KGB perifer lainnya. Sehingga ada kemungkinan aktivitas respons imun seluler dan respons imun humoralnya tidak seperti yang dibuktikan Meeusen, yaitu lebih dominan Th1 daripada Th2 (Meeusen, 1996).

Song, 1996 dari hasil penelitiannya membuktikan bahwa antigen ekso- gen tidak selalu dipresentasikan oleh MHC kelas II dan antigen endogen tidak selalu dipresentasikan oleh MHC kelas I. Pengaruh lingkungan mikro, seringkali menyebabkan antigen eksogen keluar dari jalur yang semestinya yaitu keluar dari fagosom, contoh pada *M.tuberculosis*. Sedangkan antigen endogen keluar dari jalur MHC kelas I yang disebut juga jalur konvensional melalui *transporter of antigen presentation* (TAP) pindah ke jalur MHC kelas II, yaitu antigen bergabung dengan fagosom setelah proses melewati badan Golgi. Jalur ini disebut jalur alternatif MHC kelas I (Song, 1996). Penelitian lain membuktikan bahwa suasana asam (pH) pada lingkungan mikro yang menyebabkan peptida dipresentasikan oleh MHC kelas I (Stryhn, 1996).

Smith, 1999 melakukan percobaan dengan menggunakan *immunestimulating complexes* atau ISCOMS yang berisi ajuvan *Quillaja saponaria saponin* sebagai vaksin. Pemberian parenteral atau mukosal, ternyata dapat meningkatkan respons imun humoral dan seluler melalui peningkatan

aktivitas CD4⁺T dan CD8⁺T (Smith, 1999). ISCOMS dapat pula meningkatkan respons imun alamiah melalui aktivasi neutrofil, makrofag, sel dendritik (Smith, 1999). Mediator radang yang dihasilkan dari peristiwa di atas, adalah nitrik oksid (RNI), *reactive oxygen intermediate* (ROI), IL-1, IL-6, IL-12 dan IFN- γ dengan peran IL-12 yang lebih menonjol (Smith, 1999). Kensil, 1996 dalam percobaannya pada mencit membuktikan bahwa glikosida triterpene yang berasal dari *Quillaja saponaria* mampu meningkatkan sekresi antibodi IgG1, IgG2b dan IgG2a melalui jalur T-dependen maupun T-independen dan mengaktifkan limfosit CD8⁺T (Tc1) menjadi efektor CTL (Kensil, 1996)

Pada penelitian ini imunomodulator ajuvan dipilih karena dapat menjelaskan keterkaitan antara EMCA atau FTECA dengan bangkitnya respons imun psikoneuroimunologis di daerah parakorteks KGB mesenterium tikus. Dengan demikian interaksi yang terjadi pada semua variabel psikoneuroimunologis mencerminkan fungsi semua komponen kelenjar getah bening yang ikut mempengaruhi perubahan respons imun dan dapat digambarkan dalam suatu pola, seperti terlihat pada gambar 5.11 yaitu pola variabel grup perlakuan EMCA. Indikator yang ditetapkan nantinya merupakan cerminan dari suatu konsep yang digunakan serta dapat menajamkan hasil penelitian (Widodo, 1993).

Pola interaksi variabel psikoneuroimunologis yang diperoleh merupakan gambaran interaksi semua variabel dalam mewujudkan suatu fungsi dan melibatkan semua komponen yang berakhir dengan timbulnya suatu

kelainan respons imun. Harga rerata besaran variabel masing-masing komponen tidak menggambarkan pola tertentu yang dapat dipakai untuk mewakili perubahan sebenarnya, tetapi harus dikalikan dengan suatu konstanta tertentu yang merupakan variabel pembeda yaitu koefisien Fisher. Untuk melihat adanya perbedaan antara kelompok 1,2,3 grup MECA, FTECA dan kelompok kontrol plasebo dilakukan uji manova dan hasilnya menunjukkan beda yang bermakna antara variabel grup perlakuan EMCA dan variabel dari kelompok kontrol plasebo. Hasil pengujian juga menunjukkan adanya beda yang bermakna untuk semua variabel grup perlakuan EMCA bila dibandingkan dengan variabel dari grup kontrol positif FTECA. Untuk mengetahui variabel pembeda yang dominan di antara grup tersebut, dilakukan uji analisis diskriminan.

EMCA dan FTECA yang dipergunakan pada penelitian ini berasal dari tanaman *Centella asiatica* yang mengandung senyawa kimia golongan triterpenoid saponin, maka peneliti berasumsi bahwa EMCA dan FTECA dapat pula meningkatkan respons imun seluler maupun respons imun humoral.

Asumsi ini telah terbukti, karena EMCA yang dipergunakan dalam penelitian ini dapat meningkatkan aktivitas $CD4^+T$, $M\emptyset$ disertai supresi $CD8^+T$ pada ketiga kelompok yang mendapat dosis perlakuan berbeda. Jika larutan EMCA diberikan pada seorang yang mengalami infeksi tuberkulosis, diharapkan kondisi penderita menjadi lebih baik karena kemampuan tubuh untuk melawan infeksi bertambah melalui peningkatan aktivitas $CD4^+T$ dan

MØ. larutan EMCA bila diberikan pada permulaan infeksi tuberkulosis (TB) dapat memperkuat fase protektif CD4⁺T. Pada fase protektif subpopulasi atau subset CD4⁺T protektor meningkat. Limfosit CD4⁺T protektor, mengekspresikan marker permukaan sel CD44^{hi}CD45RB^{hi} dan CD44^{hi} dan proses ini berlangsung 10 hingga 20 hari sejak dari awal infeksi. Pada saat ini belum terjadi kerusakan jaringan (Griffin, 1994). Bilamana EMCA diberikan pada minggu ke 3, pada saat subset CD4⁺T dengan marker CD44^{hi} CD45RB^{lo/neg} lebih dominan dan yang mempunyai fungsi memicu timbulnya DTH. Pemberian EMCA diharapkan dapat mengurangi kerusakan jaringan tubuh akibat terlepasnya enzim proteolitik dari makrofag yang rusak pada peristiwa DTH. Hal ini dimungkinkan, karena EMCA menekan aktivitas CD8⁺T sitotoksik. Pada fase akhir yaitu fase sitolisis yang ditandai dengan banyaknya jumlah populasi CD4⁺T dari subset CD44^{hi} CD45RB^{neg} dan terbentuknya sel memori spesifik terhadap *M.tuberculosis*. Bilamana EMCA diberikan pada fase ini, maka sel memori non-spesifik berumur pendek yang dibangkitkan EMCA dapat diganti dengan sel memori spesifik terhadap TB yang berumur lebih panjang.

Pada grup tikus yang terpapar FTECA, jumlah limfosit CD8⁺T teraktivasi lebih dominan dibandingkan dengan CD4⁺T dan disertai supresi IFN- γ dan keadaan ini menunjukkan subset Tc2 yang dominan. Bila larutan FTECA diberikan pada penderita TB, maka peranan antibodi yang menonjol. Pertama dapat berupa netralisasi antigen, kedua terjadi proses opsonisasi oleh

makrofag yang akhirnya akan dihancurkan oleh CTL, sel K dan sel NK dan ketiga melalui sistem komplemen antigen dapat dihancurkan. Peristiwa ini semua akan menimbulkan pengaruh buruk pada kerja subset $CD4^{+}T$, yaitu fase protektif akan memendek dan fase DTH serta fase sitolisis oleh $CD44^{hi}$ $CD45RB^{lo/neg}$ menjadi lebih panjang. Dengan demikian pemberian larutan EMCA pada penderita TB dapat mengurangi kerusakan jaringan hospes, sedangkan pemberian larutan FTECA menyebabkan kerusakan jaringan hospres lebih banyak.

6.1.1 Pembuktian hipotesis

Dari hasil analisis statistik seperti yang dapat dilihat pada lampiran 7, 8 dan 9 serta hasil penelitian pada bab 5 menunjukkan bahwa semua hipotesis yang diajukan pada penelitian ini telah terbukti

Hipotesis pertama yang menyatakan ada perbedaan antara grup tikus yang terpapar dengan EMCA dan kelompok plasebo terbukti, dengan taraf kemaknaan atau sig. of F sebesar 0,000 serta perbedaan yang bermakna untuk keenam variabel dengan taraf kemaknaan atau sig. of F 0,000, kecuali variabel $IFN-\gamma$ dengan taraf kemaknaan hanya 0,479, berarti tidak ada perbedaan yang bermakna antara nilai variabel $IFN-\gamma$ grup EMCA dengan $IFN-\gamma$ dari kelompok plasebo, seperti yang diuraikan pada bab 5, point 5.2.5 dan lebih lengkap lihat lampiran 7.

Hipotesis kedua yang mengatakan ada perbedaan antara tikus grup

FTECA dengan kelompok plasebo juga telah terbukti. Yaitu ada perbedaan yang bermakna untuk semua variabel dengan taraf kemaknaan atau sig. of F sebesar 0,000 dan untuk setiap variabel diperoleh taraf kemaknaan atau sig. of F 0,000. Grafik perbedaan rerata kelompok 1,2 dan 3 grup FTECA dapat dilihat pada gambar 5.9 pada bab 5 poin 5.26. Untuk perhitungan lebih lengkap dapat dilihat pada lampiran 8.

Hipotesis ketiga yang menyatakan bahwa respons imun yang dibangkitkan oleh paparan larutan EMCA menunjukkan aktivitas yang berbeda sesuai dengan dosis perlakuan yang diberikan juga telah terbukti. Pada gambar 5.8 bab 5 poin 5.2.5 dapat dilihat gambar grafiknya. Pada tikus kelompok 1 grup EMCA ke tujuh variabel mengalami perubahan sebagai berikut. Enam variabel yaitu $CD4^+T$, $M\emptyset$, $IFN-\gamma$, $slgG$, $slgA$ dan $slgM$ menunjukkan peningkatan dan satu variabel yaitu $CD8^+T$ menunjukkan penurunan atau supresi. Besarnya peningkatan masing-masing variabel adalah untuk $CD4^+T$ sebesar 10,1 poin; variabel $M\emptyset$ sebesar 112,8 poin; variabel $IFN-\gamma$ sebesar 3,7 poin; variabel $slgG$ sebesar 5 poin; variabel $slgA$ sebesar 8,8 poin dan variabel $slgM$ sebesar 4,8 poin sedangkan variabel $CD8^+T$ mengalami penurunan atau supresi sebesar -17,8 poin. Pada tikus kelompok 2 yang terpapar dengan larutan EMCA, terdapat peningkatan pada 6 variabel dan satu variabel yaitu $CD8^+T$ mengalami penurunan. Besarnya peningkatan ke enam variabel tersebut adalah, variabel $CD4^+T$ meningkat sebesar 12 poin; variabel $M\emptyset$ meningkat sebesar 15,5 poin; variabel $IFN-\gamma$

meningkat sebesar 0,6 poin dan ini merupakan peningkatan paling kecil diantara ketiga kelompok; variabel sIgG meningkat sebesar 13,5 poin; variabel sIgA meningkat sebesar 25,9 poin merupakan peningkatan paling besar dari ketiga kelompok dan variabel sIgM meningkat sebesar 9,8 poin dan nilai ini sama dengan peningkatan sIgM pada kelompok 3. Peningkatan aktivitas ke 5 variabel kelompok 2 grup EMCA paling besar diantara ketiga kelompok, kecuali variabel IFN- γ sangat kecil dibandingkan dengan kedua kelompok lainnya dan begitu pula penurunan aktivitas CD8⁺T juga paling kecil. Pada kelompok 3 grup EMCA peningkatan sekresi ketiga imunoglobulin permukaan yaitu sIgA, sIgG dan sIgM sama besar. Begitu pula jumlah makrofag sama besar dengan jumlah limfoblas atau plasma sel yang menghasilkan imunoglobulin permukaan yang besarnya masing-masing untuk sIgG sebesar 9,9 poin; sIgA sebesar 10,7 poin dan sIgM sebesar 9,8 poin. IFN- γ pada kelompok 3 grup EMCA, meningkat paling besar yaitu 4,8 poin dibandingkan dengan kedua kelompok lainnya. Pada kelompok 1 terjadi peningkatan IFN- γ sebesar 4 poin dan IFN- γ kelompok 2 meingkat 1 poin. Kalau perubahan semua variabel dari ketiga kelompok dibandingkan, maka variabel IFN- γ dan CD8⁺T menunjukkan peningkatan paling kecil diantara variabel lainnya yang terdapat pada ketiga kelompok. Malahan variabel CD8⁺T mengalami supresi cukup besar, yaitu sebesar -22,8 untuk kelompok 3; -17,8 untuk kelompok 1 dan -3,9 untuk kelompok 2. Sedangkan IFN- γ meningkat sebesar 3,7 poin pada kelompok 1, dan 0,8 poin pada kelompok 2

dan 4,8 poin pada kelompok 3. Hipotesis keempat yang menyatakan bahwa pola respons imun yang terbentuk pada ketiga kelompok tikus grup EMCA berlainan satu dengan lainnya yaitu tergantung dari dosis perlakuan yang diberikan, juga telah terbukti. Pada gambar 5.11 bab 5 poin 5.2.9. untuk tikus kelompok 1 grup EMCA yang mendapat perlakuan dengan dosis 187,50 μg pola respons imun dibentuk oleh 4 variabel yaitu $\text{CD8}^+\text{T}$, $\text{M}\emptyset$, $\text{IFN-}\gamma$ dan sIgG yang semuanya mengalami peningkatan. Hal ini mempunyai arti bahwa dosis EMCA sebesar 187,50 μg atau dosis kecil masih memberi stimulasi untuk terjadinya proliferasi serta peningkatan aktivitas $\text{CD8}^+\text{T}$ yaitu sebesar 2,1 poin. Bila EMCA diberikan dalam dosis 375,0 μg seperti yang diberikan pada tikus kelompok 2, maka terjadi supresi $\text{CD8}^+\text{T}$ paling besar yaitu -4 poin. Sedangkan pada kelompok 3 yang mendapat EMCA sebesar 750,0 μg penurunan jumlah limfosit $\text{CD8}^+\text{T}$ sebesar -3,6. Variabel $\text{M}\emptyset$ meningkat sebesar 9,115 poin pada kelompok 1 dan merupakan nilai yang tertinggi dari kedua kelompok lainnya, kemudian diikuti oleh kelompok 2 sebesar 4,881 dan 0,762 untuk kelompok 3. Variabel $\text{IFN-}\gamma$ meningkat sebesar 1,678 poin pada kelompok 1, pada kelompok 2 peningkatannya sebesar 1,655. Peningkatan paling kecil terjadi pada kelompok 3 yaitu hanya meningkat sebesar 0,082. Variabel sIgG meningkat sebesar 5,172 poin pada kelompok 1. Variabel IgG paling besar di sekresi oleh limfoblas B dan sel plasma pada tikus dari kelompok 2, yaitu sebesar 9,824 dan diikuti oleh kelompok 1 sebesar 5,172 dan sekresi IgG paling kecil dihasilkan limfoblas B dan sel

plasma dari tikus kelompok 3 yaitu sebesar 0,941. Pada grafik pola grup tikus yang mendapat EMCA, variabel CD4⁺T tidak terlihat, begitu juga dengan IgA dan IgM. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga variabel tersebut bukan merupakan variabel pembeda.

6.1.2 Mekanisme peningkatan respons imun EMCA dan FTECA

Triterpenoid saponin merupakan senyawa kimia dengan berat molekul kecil. Sebagai contoh komponen *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* dari larutan FTECA, masing-masing mempunyai berat molekul sekitar 500 Dalton dan berat molekul ketiga komponen kurang lebih 1, 5 – 2 KDa (Wagner, 1984; Shukla, 1998) dan bersifat sebagai deterjen serta mampu membangkitkan respons imun bila berinteraksi dengan molekul lain yang lebih besar yang terdapat di dalam sitosol. Senyawa kimia yang mempunyai sifat seperti itu dinamakan ajuvan (Playfair 1993).

Tanaman *Centella asiatica* yang merupakan sumber EMCA dan FTECA mengandung senyawa kimia triterpenoid saponin. Walaupun begitu, karena konsentrasi ketujuh komponen yang dikandung oleh kedua larutan tersebut berbeda satu dengan lainnya, maka mekanisme yang membangkitkan respons imun pada grup tikus yang terpapar dengan kedua larutan tadi yaitu larutan EMCA dan larutan FTECA memberi gambaran yang berbeda pula.

Pada EMCA semua komponen dari hasil ekstraksi metanol masih dalam komposisi semula, berlainan dengan grup FTECA yang hanya me-

mengandung 3 komponen yaitu *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid*. Dengan demikian dapat dipahami bahwa komponen *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* dalam larutan EMCA berjumlah sangat kecil. Apalagi dalam percobaan ini dosis EMCA dan FTECA pada setiap kelompok dibuat sama, sehingga konsentrasi setiap komponen tadi di dalam larutan EMCA menjadi sangat sangat kecil. Karena itu komponen aktif yang terdapat di dalam larutan EMCA, bekerja dengan cara yang berbeda dengan komponen aktif FTECA. Pada larutan EMCA komponen aktifnya menyebabkan makrofag lebih mengekspresikan MHC kelas II daripada MHC kelas I, sedangkan komponen aktif FTECA menyebabkan makrofag mengekspresikan MHC kelas I lebih dominan dibandingkan dengan MHC kelas II.

Keadaan ini dapat terjadi karena kemampuan makrofag mengekspresikan MHC kelas I atau MHC kelas II ternyata dipengaruhi oleh jumlah konsentrasi triterpenoid saponin dan zat lain yang terdapat di dalam larutan yang diberikan sebagai perlakuan. Ketiga komponen *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* yang terdapat di dalam FTECA merupakan lipid dan dapat diasumsikan bahwa proses masuknya ketiga komponen tadi ke dalam sitosol makrofag melalui bantuan liposom. Kenyataan ini didukung oleh data penelitian sebagai berikut: Pertama triterpenoid saponin yang terdapat di dalam ekstrak *Quillaja saponaria* atau *Qs-21* dan *Qs-7* dapat menyebabkan makrofag meningkatkan jumlah serta aktivitas $CD8^+T$ menjadi CTL (Kensil, 1998a). Kedua, peristiwa ini hanya mungkin terjadi, apabila triterpenoid saponin yang berasal dari *Qs-21* dan *Qs-7* mampu berdifusi ke dalam

sitosol makrofag dengan membentuk liposom atau dibantu oleh liposom yang dibentuk oleh sejenis lipid yang terdapat di kelenjar getah bening. Paling sedikit ada 4 cara atau mekanisme sehingga liposom dapat masuk ke dalam sitosol makrofag. Pertama melalui endositosis, kedua berdifusi spontan, ketiga melalui adsorpsi stabil dan keempat melalui transfer lipid. Dibandingkan dengan fusi, maka endositosis, adsorpsi dan transfer lipid merupakan cara atau mekanisme yang paling banyak digunakan. Fusi memegang peranan berarti pada proses interaksi liposom dengan sel, bila berada di dalam plasma. Vesikel padat atau bahan yang bersifat hidrofobik masuk ke dalam sitosol cenderung menggunakan proses absorpsi dibandingkan dengan vesikel cair, sedangkan fagosit profesional seperti makrofag menginternalisasikan vesikel dengan cara aktif yaitu melalui proses *energy-dependent phagocytic*. Sel nonfagositik juga menggunakan mekanisme endositosis untuk memasukkan material ke dalam sitosolnya. Kadang-kadang *water soluble liposome* dapat masuk ke dalam sitosol melalui *unstirred layer mechanism*. *unstirred layer mechanism* yaitu molekul keluar dari liposom pada saat berada dekat permukaan sel membran, karena dipengaruhi sel atau karena spontan. Mekanisme ini dipengaruhi oleh koefisien difusi (Ostro, 1987). Di dalam sitosol, liposom akan pecah oleh enzim yang terdapat di dalam sitosol dan partikel yang dibawanya akan lepas dan tersebar di dalam sitosol. Apabila partikel ini suatu peptida atau suatu antigen, maka ia akan mengalami penguraian oleh proteosom dan selanjutnya melalui proses endogen akan di paparkan makrofag dengan

selanjutnya melalui proses endogen akan di paparkan makrofag dengan bantuan MHC kelas I kepada limfosit CD8⁺ (Harding, 1997). Ketiga triterpenoid saponin memicu makrofag untuk mengekspresikan MHC kelas I dan MHC kelas II (Harding, 1991). Keempat triterpenoid saponin merupakan senyawa kimia bersifat deterjen yang mampu menurunkan tegangan permukaan sel membran (Heyne, 1987). Karena itu molekul triterpenoid saponin Qs-21 dan Qs-7 dari ekstrak *Quillaja saponaria* masuk ke dalam sitosol makrofag setelah berdifusi melewati membran sel (Kensil, 1991; Kensil, 1996a). Kelima hasil pengukuran HPLC terbukti, bahwa kedua larutan mengandung komponen yang tidak sama. Konsentrasi *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* di dalam larutan EMCA sangat kecil. Keenam dari hasil penelitian Song, 1966 terbukti bahwa pada kondisi dan lingkungan mikro makrofag dapat pula mengubah jalur presentasi antigen. Antigen eksogen yang seharusnya dipresentasikan oleh MHC kelas II beralih menjadi MHC kelas I dan antigen endogen yang seharusnya dipresentasikan oleh MHC kelas I berubah menjadi MHC kelas II (Song, 1996).

Dengan menggunakan asumsi yang sama mengenai sifat-sifat triterpenoid saponin serta melihat hasil analisis data yang diperoleh dari tikus grup EMCA dan grup FTECA dan kontrol plasebo, maka mekanisme yang dipergunakan EMCA berbeda dengan FTECA untuk membangkitkan respons imun. Larutan EMCA karena mengandung komponen *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* dalam jumlah sangat kecil akan mengaktifkan makrofag untuk mengekspresikan MHC kelas II, sedangkan larutan

FTECA yang mengandung ketiga komponen tersebut dalam jumlah banyak, akan memicu sebagian populasi makrofag untuk mengekspresikan MHC kelas II dan sebagian populasi lainnya mengekspresikan MHC kelas I. Terbukti dengan meningkatnya jumlah limfosit CD8⁺T dan sIgA, sIgG dan sIgM.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, sebagian besar komponen yang larut di dalam larutan EMCA akan masuk ke dalam sitosol makrofag melalui jalur eksogen yaitu *endocytic pathway*. Komponen EMCA ini, berada di dalam fagosom melalui *receptor mediated endocytosis*. Selanjutnya terjadi penggabungan fagosom dengan liposom untuk membentuk fagolisosom, melalui fagolisosom komponen EMCA akan dipresentasikan ke CD4⁺T oleh MHC kelas II, karena konsentrasi ketiga komponen triterpenoid saponin yaitu asiaticoside, asiatic acid dan madecassic acid yang terdapat di dalam larutan EMCA sangat kecil, bila dibandingkan dengan FTECA. Terbukti dengan CD8⁺T mengalami supresi pada ketiga kelompok grup EMCA dan keadaan ini menunjukkan bahwa pembentukan liposom tidak terjadi, sehingga makrofag tidak mengekspresikan MHC kelas I. Data dapat dilihat pada tabel 5.5 dan gambar 5.8 dan lebih rinci pada lampiran 7.

Berlainan dengan grup tikus yang terpapar larutan FTECA, terlihat adanya peningkatan jumlah limfosit CD8⁺T yang sangat tinggi bila dibandingkan dengan grup tikus yang terpapar dengan EMCA. Hal ini membuktikan bahwa triterpenoid saponin yang terdapat di dalam larutan FTECA telah membentuk liposom di dalam sitosol makrofag. Selanjutnya triterpenoid

saponin akan di proses oleh proteasom menjadi fragmen yang lebih kecil dan dengan bantuan TAP akan memasuki endoplasmik retikulum (Peakman, 1997c). Fungsi proteasom ini dilaksanakan oleh komponen LMP-2, LMP-7 dan LMP 10 (Nandi, 1996). Di dalam endoplasmik retikulum fragmen-fragmen FTECA akan berikatan dengan β -m (β_2 -microglobulin). Pada perjalanan selanjutnya fragmen ini akan dilindungi oleh calnexin - bertindak sebagai chaperon terhadap enzim perusak - pada waktu memasuki badan Golgi dan selanjutnya melalui sekretori vesikel, fragmen FTECA yang terikat pada MHC kelas I akan dipresentasikan ke CD8⁺T. Sebagian fragmen triterpenoid saponin atau fragmen FTECA akan dipresentasikan oleh MHC kelas II ke CD4⁺T (Hasegawa, 1994a; Hasegawa, 1994b; Harding, 1997). Kedua jalur ini, dipergunakan oleh komponen yang terdapat pada larutan FTECA untuk mengaktifkan CD4⁺T dan CD8⁺T.

Dengan penjelasan di atas dapat pula disimpulkan bahwa larutan EMCA dan larutan FTECA menyebabkan peningkatan aktivitas Th1 dan aktivitas Th2 pada KGB mesenterium yang tidak jauh berbeda satu dengan lainnya. Jadi berbeda dengan hasil penelitian Meeusen 1996 yang mengatakan pada KGB perifer aktivitas Th1 lebih dominan daripada Th2.

Dengan demikian terbukti mekanisme yang dipergunakan triterpenoid saponin ekstrak *Quillaja saponaria* sebagai stimulator ajuvan berbeda dengan mekanisme yang dipergunakan triterpenoid saponin ekstrak metanol *Centella asiatica* (EMCA) dan berbeda pula dengan mekanisme yang diper-

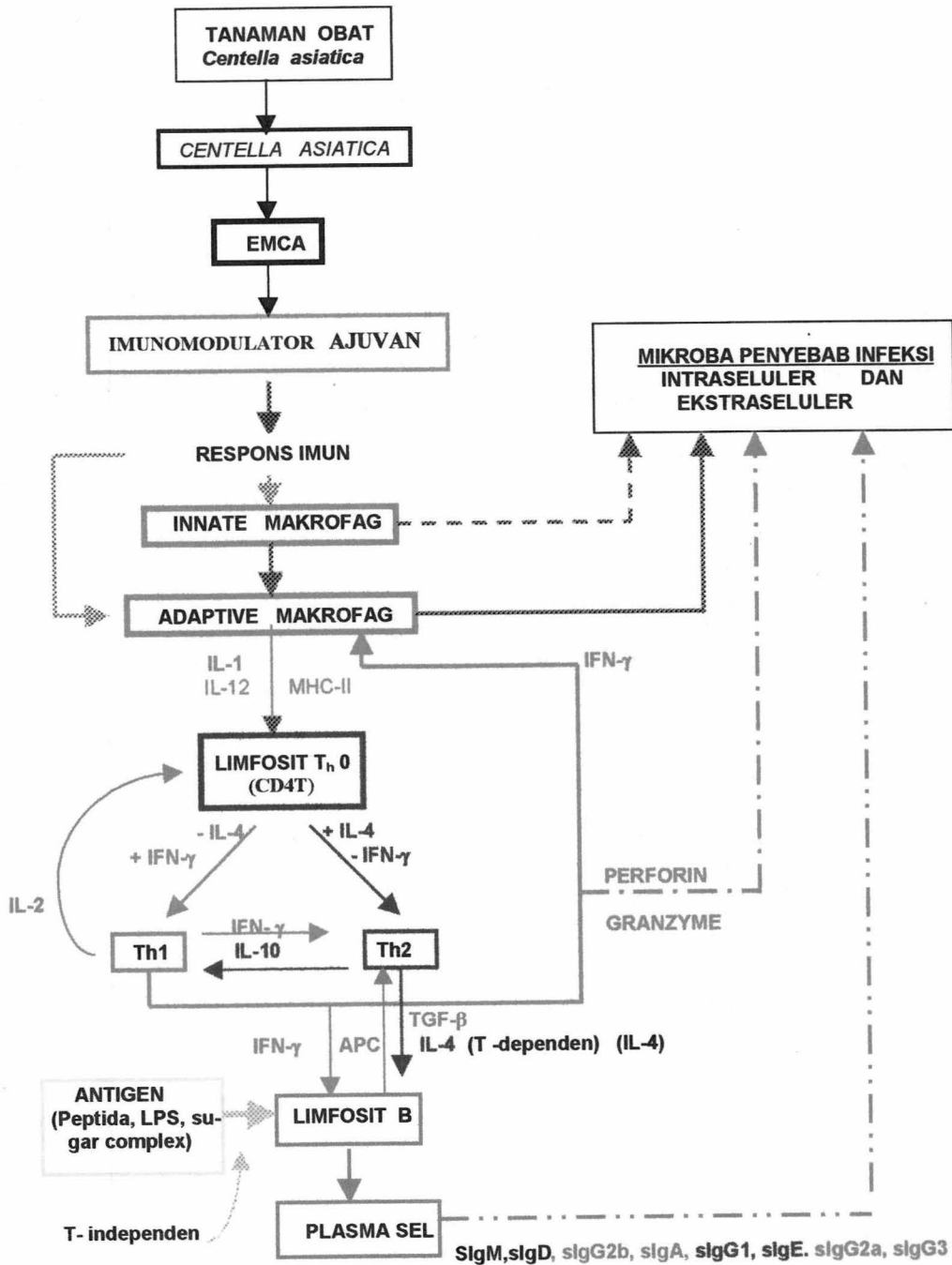
gunakan triterpenoid saponin fraksi terstandar *Centella asiatica* (FTECA).

Pada penderita tuberkulosis paru, jika *M.tuberculosis* masuk ke dalam tubuh melalui saluran makanan atau saluran pernapasan, maka dosis 375,0 µg pada kelompok 2 grup EMCA menjadi pilihan pertama dan kelompok 3 grup EMCA dengan dosis 750,0 µg merupakan pilihan kedua. Pilihan pemberian EMCA berdasarkan dosis di atas, disebabkan karena adanya peningkatan aktivitas $M\phi$ dan $CD4^+T$ dan sekresi sIgA yang disertai supresi $CD8^+T$ paling tinggi, dengan demikian kemungkinan kerusakan jaringan pada proses khronis akan terjadi sedikit mungkin. Untuk infeksi akut yang disebabkan mikroorganisme intraseluler, dosis 375,0 µg yang diberikan pada kelompok 2 grup EMCA menjadi pilihan utama, karena aktivitas $CD4^+T$ dan $M\phi$ paling tinggi, sekresi imunoglobulin sIgG dan sIgM besar disertai supresi $CD8^+T$ paling kecil. Larutan FTECA dapat membangkitkan respons imun untuk melawan infeksi mikroorganisme intraseluler. Ketiga kelompok grup FTECA menunjukkan aktivitas $CD8^+T$ yang meningkat, terutama pada kelompok 1 yang diberi dosis FTECA sebesar 187,50 µg, kelompok 2 dengan dosis FTECA sebesar 375,0 µg. Pada infeksi intraseluler aktivitas $CD8^+T$ diperlukan, maka FTECA dosis 750,0 µg merupakan pilihan terbaik. Pemberian larutan FTECA sebagai obat, mempunyai resiko kerusakan jaringan. Hal ini disebabkan jumlah serta aktivitas $CD8^+T$ meningkat akan menimbulkan reaksi DTH yang besar, sehingga kerusakan jaringan yang ditimbulkannya akan lebih besar pula. Karena itu sebaiknya larutan FTECA

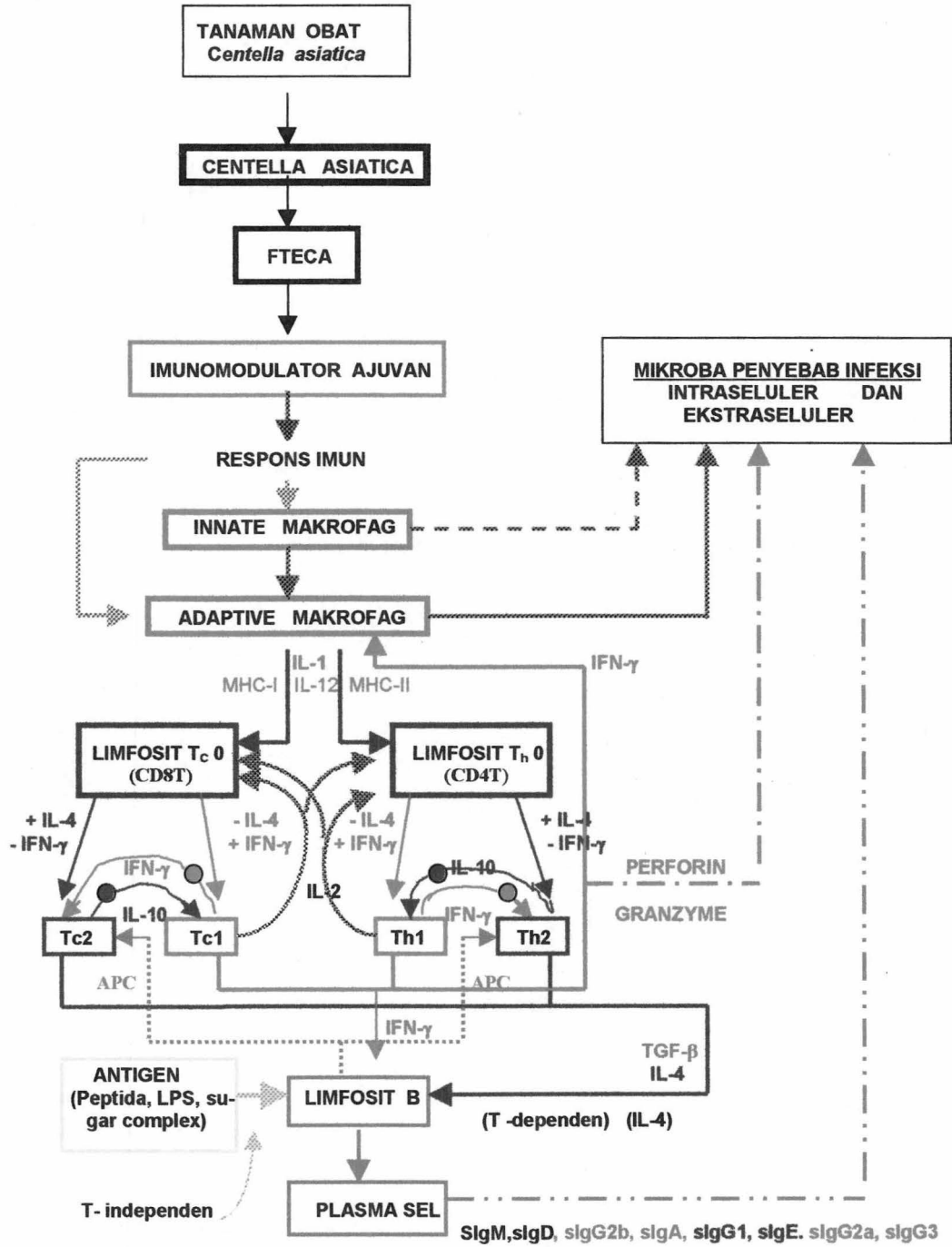


dipergunakan dalam kasus akut yang memerlukan waktu singkat. Dengan demikian kerusakan jaringan host yang mungkin terjadi sebagai akibat limfosit sitotoksik CD8⁺T dapat dikurangi. Hasil penelitian menunjukkan konsep yang dipergunakan EMCA dan FTECA dalam meningkatkan respons imun berbeda satu dengan lainnya, karena itu perlu dibuat skema baru mengenai konsep ini.

KONSEP: EMCA MEMBANGKITKAN RESPONS IMUN



KONSEP: FTECA MEMBANGKITKAN RESPONS IMUN



BAB 7

Bab 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

1. Grup EMCA meningkatkan respons imun seluler dan humoral dengan beda bermakna pada taraf kemaknaan atau sig of F sebesar 0,000 bila dibandingkan dengan larutan garam faali atau plasebo sebagai kontrol negatif.
2. Komponen aktif yang terkandung di dalam grup FTECA meningkatkan respons imun seluler dan humoral dengan beda bermakna pada taraf kemaknaan atau sig of F sebesar 0,000 bila dibandingkan dengan larutan kontrol plasebo.
3. Perubahan respons imun dari ketujuh variabel daerah parakorteks KGB mesenterium tikus berbeda untuk setiap dosis perlakuan EMCA yang diberikan, yaitu pada kelompok 1 EMCA. Telah terjadi peningkatan CD4⁺T sebesar 10,1; peningkatan MØ sebesar 12,6; peningkatan IFN- γ sebesar 3,7; peningkatan sIgG sebesar 5,0; peningkatan sIgA sebesar 8,8; peningkatan sIgM sebesar 4,5 dan untuk variabel CD8⁺T mengalami penurunan sebesar -17,8.

Pada kelompok 2 EMCA, tampak variabel CD4⁺T mengalami peningkatan sebesar 12,0; variabel MØ mengalami peningkatan sebesar 15,5; variabel IFN- γ meningkat sebesar 0,6; sIgG meningkat sebesar 13,5; sIgA

meningkat sebesar 25,9; sIgM meningkat sebesar 9,8 dan variabel CD8⁺T mengalami penurunan sebesar -3,9.

Pada kelompok 3 EMCA variabel yang mengalami peningkatan adalah CD4⁺T sebesar 4,7; variabel M \emptyset meningkat sebesar 10; variabel IFN- γ meningkat sebesar 4,6; sIgG meningkat sebesar 9,9; variabel sIgA meningkat sebesar 10,7; sIgM meningkat sebesar 9,5 dan variabel CD8⁺T mengalami penurunan sebesar -22,5.

4. Pola respons imun yang terbentuk untuk ketiga kelompok grup EMCA berbeda sesuai dengan dosis perlakuan yang diberi yaitu 187,50 μ g untuk kelompok 1; Dosis 375,0 μ g untuk kelompok 2 dan dan untuk kelompok 3 grup EMCA diberikan dosis sebesar 750,0 μ g.per 100 gram berat badan tikus.

Pola setiap kelompok pada grup EMCA sebagai berikut, yaitu:

- a. Untuk kelompok 1 EMCA, ada 4 variabel pembeda dengan pola sebagai berikut: M \emptyset (9,116), sIgG (6,172), CD8⁺T (2,1), dan IFN- γ (1,678).
 - b. Kelompok 2 EMCA, ada 4 variabel pembeda dengan pola sebagai berikut: IgG (9,624), M \emptyset (4,661), IFN- γ (1,655) dan CD8⁺T (- 3,9).
 - c. Pola kelompok 3 EMCA, ada 4 variabel pembeda dengan pola sebagai berikut: IgG (0,941). M \emptyset (0,762), IFN- γ (0,082) dan CD8⁺T (-3,3).
5. Hasil penelitian menunjukkan konsep yang dipergunakan EMCA dan FTECA berbeda dalam meningkatkan respons imun.

7.2. Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk menentukan besarnya komponen *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* serta komponen lainnya yang terdapat pada EMCA atau tanaman *Centella asiatica* yang tumbuh di Batu-Malang.
 2. Perlu diadakan suatu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui komponen aktif pada EMCA yang berfungsi meningkatkan sistem imun Th1 dan Th2.
 3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Centella asiatica* terhadap infeksi tuberkulosis paru manusia.
 4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, untuk mengetahui efek ekstrak *Centella asiatica* pada infeksi intraseluler lainnya seperti virus dan sel kanker.
-

DAFTAR PUSTAKA

PUSTAKA ACUAN

- Abdul Manaf.1995. Penggunaan Panduan Obat Baru Dalam Meningkatkan Keberhasilan Program Pemberantasan Tuberkulosis Paru, *Recent advances in respiratory medicine* , Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, Bandung, hal. 10-20.
- Adkins , 1987. Early events in T – cell maturation, *Ann Rev Immunol*, 5: 325. ✓
- Angela HM, Tony Pickup,1998. Penyembuhan dengan Ayurveda, Jakarta, PT Gramedia Pustaka Utama.
- Arjatmo Tj, Budi Utomo, Bintari Rukmono, 1981. Dasar-Dasar Metodologi Ilmu Kedokteran, Penerbit Departemen P & K, Konsorsium Ilmu Kedokteran, Jakarta.
- Arpaia M R, Ferrone R, Amitrano M, Nappo C, Leonardo G, Del Guercio R.1990. Effects *Centella asiatica extract* on Mucopolysaccharide Metabolism in Subjects with Varicose Veins. *Int. J. Clin. Pahrm. Res.* X (4), 229-233.
- Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. 1974. The Laboratory Rat, *Volume 1- Biology and Diseases; Volume 2- Research Applications*, Academic Press Inc- Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Beck JS, Potts RC, Kardjito T and Grange JM, 1985. CD4⁺T lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis, *Clin Exp Immunol*, 60, 49-54.
- Bellamy R, 1998. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations, *Thorax*; 53: 588-593.
- Blotta MH, Marshall JD, Dekruyff RH, and Umetsu DT, 1996. Cross-Linking of the CD40 Ligand on Human CD4⁺T Lymphocytes Generates a Co-

- stimulatory Signal That Up-Regulates IL-4 Synthesis, *The Journal of Immunology*;156: 3133-3140.
- Bonte F, Dumas M, Chaudagne C, Meybeck A, 1995. Comparative activity of asiaticoside and madecassoside on type I and III Collagen synthesis by cultured human fibroblasts. *Ann Pharm Fr* ; 53 (1): 38-42.
- Budd RC, Cerottini JC, Horvath C, 1987. Distinction of virgin and memory T lymphocytes, *J Immunol*;138: 3120-3129
- Butcher EC, Picker LJ, 1996. Lymphocyte homing and homeostasis, *Science*;272: 60. ✓
- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, and Bielefeldt OH, 1992. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*, *Science* ; 257: 539-542.
- Catovsky D, 1976. Morphology recognition of Lymphocytes and Macrophages. In *Lymphocytes, Macrophages and Cancer*, edited by G mathe, I.Florentin, MC Simmler, Springer-Verlag, Berliun Heidelberg, New York, 1-7. ✓
- Cooper AM, Roberts AD, Rhodes EM, 1995. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *M.tuberculosis* infection, *Immunology*,84; 423-432.
- Danloy S, Qoetin-Leclercq J, Couke P, De-Pauw-Gillet MC, Elias R, Balansard G, Angenot L, Bassleer R.1994. Effects of alpha-hederin, a saponin extracted from *Hadera helix*, on cells cultured in vitro. *Planta-Med.* Feb. 68 (1): 45-49.
- Dannenber AM Jr, 1994. Pathogenesis and Immunology Basic Aspects, *Tuberculosis*, editor Schlossberg D, third edition, Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo HongKong Barcelona Budapest, ch2 pp. 17-39.

- Debrick JE, Campbell PA, and Staerz UD, (1991). Macrophages as accessory cells for class-1 MHC-restricted immune responses. *J Immunol*; 147: 2846.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1977. Monografi *Centella asiatica (L) urban, Materia Medika Indonesia*, Jilid I., hal. 23-26.
- Departemen Kesehatan RI, 1981. Pemanfaatan Tumbuhan Obat,. *Warta Tanaman Obat Indonesia*, Vol 1 no 2 April.
- Departemen Kesehatan RI, 1990. Pedoman pemberantasan Tuberkulosis Paru. *Diterbitkan oleh: Direktorat Jendral Pencegahan Penyakit Menular dan penyehatan Lingkungan Pemukiman, (DITJEN. PPM & PLP) - Jakarta*
- Dinas Kesehatan Daerah Unit Materia Medica, 1993. Pedoman Pemanfaatan Tanaman Obat Untuk Kesehatan Keluarga,- *Diterbitkan oleh Pemerintah propinsi Tingkat I Jawa Timur. Batu- Malang.*
- Ekstra Farmakope Indonesia, 1974. *Anetholum*. Hal 55.
- Enarson DA, Ashley MJ, Grzybowski S, 1980. Nonrespiratory tuberculosis in Canada: Epidemiologic and bacteriologic feature, *Am J Epidemiol*; 112: 341-351.
- Enarson DA and Annik Rouillon,.1994. The Epidemiological Basis of Tuberculosis Control, *Clinical Tuberculosis*, edired by Davies PDO, Chapman & Hall Medical, ch 2 p19-55.
- Evans, WC. 1989. Trease and Evanz' Pharmacognosy, *Saponins, Cardio-active drugs and Other Steroids*, thirteenth edition, Bailliere Tindall, London-Philadelphia-Toronto, Sydney, Tokyo, pp 460-493.
- Favel A, Steimetz Regli P, Vidal Olivier E, Elias R, Balansard G. 1994. In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. *Planta-Med.* Feb. 60 (1):

50-53.

Gasperz V ,1992a. *Analisis Diskriminan-Teknik Analisis Dalam Penelitian*, Penerbit " Tarsito " Bandung, buku I, bab XX, hal 334- 388.

Gasperz V,1992b. *Analisis Ragam Multivariat-Teknik Analisis Dalam Penelitian*, Penerbit " Tarsito " Bandung, buku II, bab XXX, hal 486 - 552.

Ghosh MN. 1971. Toxicity studies, *Fundamentals of Experimental Pharmacology*, *Scientific Book Agency*, Calcutta 1. Ch.13, pp.84--88.

Griffin JP, Orme IM, 1994.. Evolution of CD4⁺T cell subsets following infection of naïve and memory immune mice with *M. tuberculosis*, *Infect Immun*,62: 1683-1690.

Halloran PF,1993. Interferon- γ , prototype of the proinflammatory cytokines- importance in activation, supression, and maintenance of the immune response, *Transplant Proc*, 25: suppl 1: 10.

Harborne JB, 1983. Metode Analisis tumbuhan, *Metode Fitokimia-Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*, Penerbit ITB- Bandung, bab 1, hal 1-46.

Harding CV, Collins DS, Kanagawa O, and Unanae ER, 1997. Liposome-encapsulated antigens engender lysosomal processing for class-II MHC presentation and cytosolic processing for class-I presentation, *J Immunol* ;147: 3860.

Herseowitz HB, 1993. *Imunofisiologi: Fungsi sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi*, *Immunologi's Bellanti*, diterjemahkan oleh Wahab S dan Soeripto N, Gajah mada Press, bab 7, hal 126-172.

Heyne K,1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia III*. Badan Litbang Departemen Kehutanan Jakarta-Cetakan I, hal.1544-1545

- Hobbs MV, Ernst DN, 1995. The Role of Cytokines in Aging, *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy* edited by Aggarwal BB and Puri RK, Blackwell Science, ch23,pp 353-367.
- Hoffman DL,1996. Immuno-stimulatiuon, Immunomodulation or what ?, *Herbal Medicine*, [http://206.135.37.254/LIBRARY/Books/Hoffman/Immune/Immu- no.htm](http://206.135.37.254/LIBRARY/Books/Hoffman/Immune/Immu-no.htm).
- Ikuta , 1992. Lymphocyte development from stem cells, *Ann Rev Immunol*; 10: 759. ✓
- Imboden JB, 1997. T lymphocytes & Natural Killer cells, *A Lange Medical book- Medical Immunology*, by Stites DP, Terr AI, Tristram GP, International-Prentice-Hall International Inc, 9 th ed, ch 9: 130-145. ✓
- Jackson AL, 1993. Antigen dan Imunogenitas- *Imunologi III* bab 4, hal 86-95.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, 1999. T- Cell Mediated immunity- Part IV- The Adaptive Immune response, *Immunobiology*, 4 th edition 263-422. ✓
- Kamogawa Y, Minasi LE, Carding SR, Bottomly K and Flavell RA, 1993. The relationship of IL-4 and IFN- γ producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells, *Cell* ;75: 985-995.
- Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, 1992. IFN- γ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* *J Immunol*, 148; 2887-2893.
- Kensil CR, Patel U, Lennik M, and Marciani D, 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria molina cortex*, *J. immunol*;146:431.
- Kensil CR,1996. Saponin as vaccine adjuvants, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*,13:1-2, 1-55.
- Kensil CR,Wu JY, Anderson CA, Wheeler DA, Amsden J, 1998a. QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants,*Dev Biol Stand*, vol 92, 41-47

- Kensil CR, Kammer R, 1998b. QS-21: A water-soluble triterpene glycoside adjuvant, *Expert Opinion on Investigational Drugs*-vol 7 no 9, pp 1475-1482.
- Kincade PW, 1989. Cells and molecules that regulate B lymphocyte in bone marrow, *Ann Rev Immunol*; 7 : 111.
- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection, *Cell*, 148; 1792-1796.
- Kuby J, 1992a. Cytokines, *Immunology*, WH Freeman and Company New York, ch 11, pp 245-270.
- Kuby J, 1992b. Cells and Organs of the Immune System, *Immunology*, WH Freeman and Company New York, ch 3, pp 39-72. ✓
- Katz P, 1993. Pengaturan imun (imunomodulasi): penguatan imun (imunopotensiasi), toleransi dan penekanan imun (imunopresisi) dari *Immunology III* - Bellanti JA, edisi Indonesia oleh Wahab SA dan Soeripto N, Gajah Mada University Press, bab 10, hal 203-211.
- Laochumroonvorapong P, Jie Wang, Chau Ching Iiu, Weiguo Ye, Moriera AL, Elkon KB, Freedman VH, Kaplan G, 1997. Perforin, a Cytotoxic Molecule Which Mediates Cell Necrosis Is Not Required for the Early Control of Mycobacterial Infection in Mice, *Infection and Immunity*, Jan, p. 127-132.
- Lawrence GHM. 1981. Taxonomi of Vascular Plants. The Mac Millan Comp., New York.
- Lee WT, Vitetta ES, 1991. The differential expression of homing and adhesion molecules on virgin and memory T cells in the mouse, *Cell Immunol*; 132: 215-222.
- Leung AN, 1999. State of the Art-Pulmonary Tuberculosis: The Essentials, *Radiology*, 210: 307-322.

- Liu J, Liu Y, Mao Q, Klaassen, C.D. 1994. The effects 10 triterpenoid compound on experimental liver injury in mice. *Fundam- Appl-Toxicol.* Jan. 22 (1): 34-40.
- Mac Lennan ICM, 1994. Germinal centers, *Ann Rev Immunol*, 12;117. ✓
- Madecassol, 1990. Titrated Extract of *Centella asiatica*, Manufactured by PT. Corsa Indonesia Ltd. Under license of Laboratories Laroche Navarron, France.
- Male DP, Champion B, Cooke A, Owen M, 1994. *Advanced Immunology*, 2 nd ed.; New York, Gower Med. Publisher.
- Manly BFJ, 1986. *Multivariate-Statistical Methods- A primer*, Chapman and Hall, London New York ; ch 7, p 86.
- Maquart FX, Bellon G, Gillery P, Wegrowski Y, Borel JP. 1990. Stimulaton of Collagen Synthesis in Fibroblast Cultures by a Triterpene Ekstrakt from *Centella asiatica*. *Connect-Tissue-Res.* 24 (2):p. 107-128.
- Maquart FX, Chastang F, Simeon A, Birembaut P, Gillery P, Wegrowski Y, 1999. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulates extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds, *Eur J Dermatol* 9:4 289-296.
- Margono BP, 1999. Guru besar Ilmu Penyakit Paru pada FK. Unair sebagai Ketua tim peneliti DepKes RI wilayah Jawa Timur mengenai prevalensi tuberkulosis paru di Indonesia (Hubungan pribadi).
- Masihi KN, 1999. Immunostimulants as anti infectives , *Principles of Immunopharmacology* edited by Nijkamp FP and Parnham MJ, publisher Birkhauser Verlag, Basel Boston Berlin, ch 6 p 309-326
- Mayer RJ, Walker HJ, 1987. *Immunochemical Methods in cell and Molecular Biology*, Academic Press, *Harcourt Bruce Jovanovich Publishers*, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto.
- Meeusen ENT, Premier RR, and Brandon MR, 1996. Tissue-specific migration of lymphocytes: a key role for Th1 and Th2 Cells ?, *View point-*

Immunology to day, vol 17 no.9 September.

- Medda S, Das N, Mahato SB, Mahadevan PR, Basu MK, 1995. Glycoside-bearing liposomal delivery systems against macrophage-associated disorders involving *Mycobacterium leprae* and *Mycocabterium tuberculosis*, *Indian J Biochem*,32 (3): 147- 151(Jun).
- Mosmann TR, Subash Sad, 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and More, *Review Immunology Today*, 138, vol 17 no 3.
- Nandi D, Jiong H and Monaco JJ, 1996. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN- γ inducible proteasome subunit, *The Journal of Immunology*, 156: 2361-2364.
- Newman MJ, Wu JY, Gardner BH, Munroe KJ, Leombruno D, Recchia J, Kensil CR, Coughlin RT, 1992. Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses,*J Immunol*, 148; 8: 2357-2362
- Nurhayati E, 1980. Uji Efek Diuretik Akar Imperata Cylindrics dan *Centella asiatica (L) Urban* pada tikus putih jantan. Skripsi Jurusan Farmasi, FMIPA Institut Teknologi Bandung.
- O'Garra A, and Murphy K, 1995. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells,*Chem. Immunol*, 63, 1-13.
- Ogra PL, Lamm ME, Mc Ghee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J. 1994. Handbook of Mucosal Immunology. Academic Press, Inc., San Diego, New York, London, Sydney, Tokyo, Toronto. ✓
- Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, Maino V, Davis K, Murphy K and O'Garra A, 1995. Heterogeneity of intracellular cytokines synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations, *J Exp Med*,;182: 1357-1367.
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, 1997. Interferon- cytokines, *Medical Immunology* by Stites D, Terr AI and Parslow TG, ninth edition- Prentice Hall international, Ch 10 pp. 157-158.

- Orme IM 1978. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *M. tuberculosis*, *J Immunol*, 138: 293-298
- Orme Ian, Miller ES, Roberts AD, 1992 T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection, *J Immunol*, 148; 189-196.
- Orme Ian, 1995. The Immune Response to Tuberculosis, *Immunity Mucobacteria-Medical Intelligence unit-* Springer-Verlag-R.G.Landes Company, ch 3 pp. 27-110.
- Ostro MJ, 1987. Liposomes in the Diagnosis and treatment of Cancer, *Liposome –from biophysics to therapeutics*, Marcel Dekker Inc, New York and Basel, ch 9, pp 277- 338.
- Ozarko G.1995. *Centella asiatica*, this page designed & written by Gary Ozarko; Internet; <http://www.ion.com.au/~Iridology/Centella.html>.
- Paget & Barnes, 1964, Evaluation of Drug Activities, *Pharmacometrics*, eds. Laurence and Bacharach, vol 1, Academic Press, New York.
- Parslow TG, 1997a. Lymphocyte & Lymphoid tissues, *Medical Immunology* by Stites DP, Terr AI, Parslow TG, 9 th edition , Prentice-Hall International Inc, ch 3, p 43-63.
- Parslow TG, 1997b. Innate Immunity, *Medical Immunology* by Stites DP, Terr AI, Parslow TG, 9 th edition , Prentice-Hall International Inc, ch 2, p 25-42.
- Parnham MJ, 1999. Mild plant and dietary imunostimulants, *Principles of Immunopharmacology* edited by Nijkamp FP and Parnham MJ, publisher Birkhauser Verlag, Basel Boston Berlin, ch 7 p 327-336
- Paryono P,1994. Mengolah Data Statistik dengan SPSS/PC+,penerbit Andi Offset Yogyakarta.
- Peakman M, Vergani D. 1997a. Anatomy and cells of the immune system, *Basic and Clinical Immunology*, ch 1, pp 1-8 ✓

- Peakman M, Vergani D. 1997b. Cellular immune responses: macrophages, dendritic cells and B lymphocytes Acquired: *Basic and Clinical Immunology*, ch 6, pp 68-80
- Peakman M, Vergani D. 1997c. Cellular immune responses: T lymphocytes, antigen presentation and natural killers, *Basic and Clinical Immunology*, ch 7, pp 81-109.
- Perry LM, 1980. Medicinal Plants of East and South East Asia. MIT Press USA.
- Perry NB, Foster LM. 1994. Antiviral and antifungal flavonoids, plus a triterpenen from *Hebe cupressoides*, *Planta-Med.* 68 (5):491-495.
- Peterkofsky B and Diegelman R. 1971. Use of a mixture of protein- ase free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry*, 10, 988-994.
- Pfeiffer C, Stein J, Southwood S, Ketelaar H, Sette A and Bottomly K, 1995. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivi, *J. Exp. Med.*; 181: 1569-1574.
- Playfair JHL, 1993. Immunostimulation and vaccination, *Immunology at a Glance*, fifth edition, ch 40, Blackwell Scientific Publications
- Popov AM, Atopkina LM, Sanishina NF, Uvarova NI. 1994. Immunomodulating activity of tetracyclic triterpene glycosides of the dammarane and holostane series. *Antibiot- Khimioter*, 39 (9-10): 19-25.
- Pramono S, 1992. Profil kromatogram ekstrak herba pegagan yang berefek antihipertensi, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, vol1 no 2, April 1992.
- Putra ST, 1984. Perubahan Gambaran Sitologik Kelenjar Getah Bening daan Kadar Gama Globulin Serum Marmot Akibat Inyeksi Vaksin Marek, *Tesis, fakulats Pascva sarjana.* ✓

- Raviglione MC, Snider DE, Jr, Kochi A, 1995. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic, *JAMA* ; 273: 220-226.
- Raviglione MC, Dye C, Schmidt S, Kochi A, 1997. Assessment of worldwide tuberculosis control, *Lancet*, 350: 624-629 (Medline).
- Reiner SL, Wang ZE, Hatam F, Scott P, and Locksley RM, 1993. Th1 and Th2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis, *Science*, 259: 1457-1460.
- Robb-Smith AHT, Taylor CR, 1981. *Lymph Node Biopsy*, Muller –Heiden Ltd. USA, 9-147. ✓
- Robey D, Fowlkes BJ, 1994. Selective in T- cells development, *Ann Rev Immunol*, 12: 675. ✓
- Robinson T, 1991. Isolasi, *Kandungan organik tumbuhan tinggi*, Penerbit ITB-Bandung, edisi ke 6, bab 1, hal 4-5.
- Roche Nicholas Lab, 1998. Botanical data about *Centella asiatica asiatica*-<http://www.centella-asiatica.com/index2.html>.
- Roger Grant and Claire Grant, 1988. Topic D, *Chemical Dictionary*, 5 th, pp 170.
- Romagnani S, 1996. Short Analytical Review Th1 and Th2 in Human Diseases, *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol 80 no.3 pp. 225-235 (September)..
- Romagnani S, 1997. The Thi/Th2 paradigm, *Immunology today-EFIS overview*, vol 13 no 6 66 365-366. ✓
- Schlossberg D, 1994. *Tuberculosis*, Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo HongKong Barcelona Budapest, third

edition.

Smith RE, Donachie AM, Grdic D, Lycke N, Mowat AM, 1999. Immunestimulating complexes induce an IL-12 dependent cascade of innate immune responses, *J Immunol* 162:9; 5536-5546 (May).

Springer TA, 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration, the multistep paradigm, *cell*,76: 301. ✓

Siswandono, Bambang Soekardjo, 1995. Kimia Medisinal, *Teori interaksi obat-reseptor*, Airlangga University Press, Surabaya hal 67-150.

Soerahso, Yuli Widyastuti, Johnny Ria Hutapea, 1992. Tinjauan Penggunaan Pegagan Sebagai Obat Tradisional Dari Beberapa Kepustakaan, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, vol1 no 2 April 1992.

Song R and Harding CV, 1996. Roles of Proteosomes, Transportes for Antigen Presentation (TAP), and β_2 - Micrpglobulin in the Processing of Bacterial or Paticulate Antigens Via an Alternate Class I MHC Processing Pathway, *Journal of Immunology*; 156: 4182-4190.

Stansfeld AG, 1985. Introduction to Biopsy Interpretation. *Interpretation Lymphnode Biopsy*, edited by Stansfeld AG, Churchill Livingstone, London, 26-30. ✓

Stead WW and Dutt AK, 1994. Edidemiology and Host Factors.- *Tuberculosis* edited by David Schlossberg, Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg-London-Paris-Tokyo-Barcelona-Budapest - third edition, Ch1,pp 1-14

Stites DP, Terr AI, Parslow TG., 1997. *Basic & Clinical Immunology* International Edition, Eight edition A Lange Medical Book, Prentice-Hall International Inc. ✓

- Stryhn A, Pedersen LØ, Romme T, Olsen AC, Nissen MH, Thorpe CJ and Buus S, 1996. PH Dependence of MHC Class I-Restricted Peptide Presentation, *The Jouenal of Immunology*, 156: 4191-4197.
- Sudarmadji, 1996. Teknik Analisa Biokimiawi, Penerbit Liberty -Yogyakarta.
- Sudjana, 1975. Metoda Statistika, Penerbit "Tarsito" Bandung.
- Sukhla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK, Dhawan Bn, 1999. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*, *J. Rthnopharmacol*, 65 (1), 1-11.
- Sutarjadi, 1994. Prospek Penelitian Tumbuhan Obat dan Obat Tradisional, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Suwondo, 1992. Pengaruh hipotensif akut herba pegagan pada anjing yang dianestesi, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, vol 1 no.2 , hal49-52.
- Szkal AK , 1989. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune response, Structure function relationships, *Ann Rev Immunol*; 7 : 91. ✓
- Taib Saleh WBM, Indro Handoyo, Rahayoe Imam Santoso, 1999. Peninfkatan Aktivitas T helper Pada kultur Limfosit Manusia Setelah Pemberian Ftraksi Terstandar Ekstrak *centella asiatica*, *Lembaga Penelitian Unair dengan DIP Dirjen Dikti Depdikbud*, kontrak DIP no. 513/ J03.12/ PL/1998.
- Talalaj S & Czechowics AS, 1989. Herbal Remedies Harmful and Benficial Effects, Melbourne.
- Tenni R, Zanaboni G, De Agostini M P, Ross A, Bendotti C, Cetta G. 1988. Effects of triterpenoid Fraction of *centella asiatica* on Macromolecules of The Connective Matrix in human skin Fibroblast Cultures. *Ital. J. Bio-Biochem.* vol. 37, no.2, p, 69-77.

- Tjitrosoepomo G, 1994. Divisi *Spermatophyta* Taksonomi, Tumbuhan Obat-Obatan, bab 6, hal 113-295
- Trease GE, 1976. Pharmacognosy, *Angiosperms: Dicotyledones*, eleventh edition, Bailliere Tindall, London. Pp. 85-509.
- Trinchieri G, 1989. Biology of Natural Killer Cells, *Adv Immunol*, 47: 187. ✓
- Tristram GP, 1997. The Immune Response, *A Lange Medical book- Medical immunology*, by Stites DP, Terr AI, Tristram GP, International-Prentice-Hall International Inc, 9 th ed, ch 4: 63-73. ✓
- Vecchio A D, Senni I, Cossu G, Molinaro M. 1984. Effetti Della Centella Asiatica- Sull' attivita Biosintetica Di Fibroblasti in Coltura. *Farmacologia (Prat)*. vol. 39. no.10. p. 355-614.
- Walter E, and Lewis H., 1977. Plants Affecting Man's Health, *Medical Botany*, New York, John Wiley & Sons.
- Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. ,1984. *Plants Drug Analysis* (a thin layer chromaography atlas), translated by A.Scott (Th. A. Scott), Published Springer-Verlag-Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo.
- Watt J M.,1962. *The Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. E&S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London.
- Wattimena J R, Sugiarso N C, Widiyanto MB, Sukandar E Y, Soemardji A A dan Setiadi A R., 1991. *farmakodinami dan Terapi Anti Biotika*. Gajah Mada, University Press..
- Weyand CM, Goronzy JJ, 1997. Mechanisms of Disordered Immune Regulation, *Medical Immunology*, International Edition dited by Stites DP, Terr AI, Parslow TG, 9 th edition Ch 32, pp 444-455.
- Widodo J P, Herjono P, Hasan MM. ,1993. *Metode Penelitian dan Statistik Terapan*. Editor Troeboes, P. dkk. Airlangga University press.

- Widowati L, Pudjiastuti, Dea Indrari, Dian Sundari, 1992. Beberapa informasi khasiat keamanan dan fitokimia tanaman pegagan [*Celtella asiatica (L) urban*], *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, vol 1 no 2 hal 39-41.
- William JG , 1993. Interferon- γ . A key immunoregulatory lymphokine, *J Surg Res*; 54: 79.
- Winstanley PA, 1994. The Clinical Pharmacology of Antituberculosis Drugs, *Clinical Tuberculosis* edited by Davies PDO, Chapman & Hall Medical, ch 8a pp 129-140.
- World Health Organization (WHO).,1993. Treatment of tuberculosis, *Guidelines for National Programmes*.
- Youmans GP., 1979. Biologic Activities of Mycobacterial Cells and Cell Components. *Tuberculosis*. Philadelphia, Toronto, London, W.B. Saunders Company.
-

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1 s/d LAMPIRAN 3A -3 D

MEMUAT DATA PENELITIAN

LAMPIRAN 1

BERAT 20 TABLET FTECA DALAM MILIGRAM
YANG DIPERGUNAKAN UNTUK BAHAN PENELITIAN

TABEL 1

Berat tablet (FTECA) dalam gram

No. berat tablet dalam gram	No. berat tablet dalam gram	No. berat tablet dalam gram	No. berat tablet dalam gram
1 0,202325	6 0,202832	11 0,202494	16 0,204611
2 0,204366	7 0,204834	12 0,204550	17 0,202420
3 0,202420	8 0,199034	13 0,202241	18 0,208378
4 0,196445	9 0,204966	14 0,206860	19 0,206716
5 0,197680	10 0,204170	15 0,209532	20 0,212096

Prosentase kumulatif relatif:

-0,1975005 = 1 → 5% (A) -0,2075005 = 3 → 90% (E) -0,2100005 = 1 → 95% (F)

-0,2000005 = 2 → 15% (B) -0,2050005 = 7 → 75% (D) -0,2125005 = 1 → 100% (G)

-0,2025005 = 5 → 40% (C)

LAMPIRAN 2

BERAT BADAN TIKUS PADA GRUP EMCA KELOMPOK 1 (VI),
KELOMPOK 2 (VII), KELOMPOK 3 (VIII) DIUKUR DALAM GRAM
DANBERAT BADAN TIKUS PADA GRUP FTECA KELOMPOK 1 (IX),
KELOMPOK 2 (X), KELOMPOK 3 (XI) DIUKUR DALAM GRAM
DAN GRUP KONTROL PLASEBO

TABEL 1

BERAT BADAN TIKUS GRUP EMCA

110	105	110	105	115	100	110	95	105	115	110	105	105
105	105	115	110	115	95	95	110	100	105	110	120	110
105	95	120	105	105	95	115	110	115	120	105	110	110
95	105	95	115	105	100							

TABEL 2

BERAT BADAN TIKUS GRUP FTECA

110	120	110	115	100	105	105	105	105	110	115	110	95
100	110	110	120	100	120	110	110	115	105	100	115	110
115	95	110	95	115	100	110	110	105	100	110	100	105
105	100	105	110	110	115							

TABEL 3

BERAT BADAN TIKUS KELOMPOK KONTROL

100 105 105 105 110 110 105 115 105 105
 110 100 95 115 115 100 110 100 105 105

LAMPIRAN 3 A

DATA FTECA HASIL BACAAN dr WATADIANTO
 DAERAH PARAKORTEKS

No	Kel	Group	Peneliti	CD4_2	CD8_2	Mo_2	IFN_2	IgG_2	IgA_2	IgM_2
1	1	1	1	51	136	24	5	10	11	12
2	1	1	1	9	227	53	14	12	12	9
3	1	1	1	21	225	37	6	16	14	14
4	1	1	1	11	137	38	10	12	11	15
5	1	1	1	13	217	33	10	11	9	13
6	1	1	1	8	147	47	5	13	12	17
7	1	1	1	7	137	34	8	16	13	8
8	1	1	1	19	88	27	5	14	16	13
9	1	1	1	4	113	33	5	12	16	9
10	1	1	1	8	94	54	9	16	14	14
1	2	1	1	3	81	28	11	25	26	21
2	2	1	1	4	95	18	1	54	35	29
3	2	1	1	3	57	21	4	29	35	20
4	2	1	1	11	111	23	5	37	29	26
5	2	1	1	4	52	18	2	47	45	24
6	2	1	1	5	105	22	2	51	31	20
7	2	1	1	6	214	19	8	38	28	21
8	2	1	1	8	175	25	4	37	30	25
9	2	1	1	8	54	21	6	43	37	23
10	2	1	1	10	69	26	25	42	27	21
1	3	1	1	1	76	13	27	8	19	5
2	3	1	1	3	45	22	21	5	7	9
3	3	1	1	2	53	14	33	8	7	4
4	3	1	1	0	62	12	21	10	10	4
5	3	1	1	14	37	16	12	7	5	4
6	3	1	1	0	92	18	16	3	5	7
7	3	1	1	2	44	26	28	5	8	5
8	3	1	1	1	68	29	37	4	8	11
9	3	1	1	1	121	11	23	2	8	5
10	3	1	1	0	49	24	13	6	4	13
1	4	1	1	1	29	10	4	1	2	3
2	4	1	1	2	42	18	1	4	0	3
3	4	1	1	0	70	18	2	2	1	0
4	4	1	1	0	20	21	2	0	2	0
5	4	1	1	0	0	12	1	2	1	12
6	4	1	1	0	78	24	2	16	13	0
7	4	1	1	1	43	15	2	2	0	0
8	4	1	1	0	51	18	37	0	1	2
9	4	1	1	3	56	12	29	2	2	1
10	4	1	1	3	72	11	5	3	0	1

LAMPIRAN 3B
 DATA EMCA HASIL BACAAN dr.WATADIANTO
 DAERAH PARAKORTEKS

No	Kel	Group	Peneliti	CD4_2	CD8_2	Mo_2	IFN_2	IgG_2	IgA_2	IgM_2
1	1	2	1	9	7	16	14	13	8	6
2	1	2	1	7	14	30	9	5	8	8
3	1	2	1	10	44	28	11	9	11	10
4	1	2	1	17	37	28	10	7	10	6
5	1	2	1	9	20	34	12	7	9	8
6	1	2	1	10	15	28	24	5	9	4
7	1	2	1	17	47	35	6	5	13	7
8	1	2	1	12	38	28	8	10	15	10
9	1	2	1	8	32	28	15	3	11	5
10	1	2	1	11	24	32	15	9	13	7
1	2	2	1	4	36	29	5	25	14	15
2	2	2	1	27	70	42	4	13	27	9
3	2	2	1	8	43	29	4	33	30	7
4	2	2	1	7	21	29	6	32	16	17
5	2	2	1	9	59	27	6	23	24	16
6	2	2	1	20	43	35	15	21	42	8
7	2	2	1	11	33	35	9	20	47	24
8	2	2	1	14	46	37	7	79	76	11
9	2	2	1	15	38	29	17	20	17	18
10	2	2	1	14	29	29	16	22	8	8
1	3	2	1	9	9	19	16	11	10	7
2	3	2	1	9	33	26	35	12	8	14
3	3	2	1	6	28	23	9	16	12	10
4	3	2	1	4	24	30	7	19	15	10
5	3	2	1	6	15	29	7	13	8	13
6	3	2	1	6	31	28	10	15	11	13
7	3	2	1	2	17	27	9	9	12	11
8	3	2	1	3	30	26	10	5	3	10
9	3	2	1	5	33	24	15	16	11	13
10	3	2	1	5	15	27	16	7	12	14
1	4	2	1	1	29	10	4	1	3	3
2	4	2	1	2	42	18	1	4	3	3
3	4	2	1	0	70	18	2	2	0	0
4	4	2	1	0	20	21	2	0	0	0
5	4	2	1	0	0	12	1	2	12	12
6	4	2	1	0	78	24	2	16	0	0
7	4	2	1	1	43	15	2	2	0	0
8	4	2	1	0	51	18	37	0	2	2
9	4	2	1	3	56	12	29	2	1	1
10	4	2	1	3	72	11	5	3	1	1

LAMPIRAN 3C
 DATA FTECA HASIL BACAAN dr WBM. TAIB SALEH
 DAERAH PARAKORTEKS
 No Kel Group Peneliti CD4_2 CD8_2 Mo_2 IFN_2 IgG_2 IgA_2 IgM_2

1	1	1	2	51	137	25	6	11	12	14
2	1	1	2	10	230	52	13	12	12	9
3	1	1	2	21	226	37	6	15	13	12
4	1	1	2	11	137	38	10	12	10	16
5	1	1	2	13	219	34	10	11	9	14
6	1	1	2	9	150	47	6	13	12	17
7	1	1	2	7	137	33	8	16	14	7
8	1	1	2	18	90	27	5	13	17	13
9	1	1	2	5	114	32	6	15	16	10
10	1	1	2	8	95	54	8	16	13	13
1	2	1	2	4	83	28	11	25	28	22
2	2	1	2	4	95	19	2	55	35	29
3	2	1	2	3	57	21	4	29	35	20
4	2	1	2	9	112	24	5	38	29	28
5	2	1	2	4	52	18	2	46	44	25
6	2	1	2	5	105	21	3	52	31	20
7	2	1	2	7	217	20	8	38	29	21
8	2	1	2	8	177	24	4	37	30	24
9	2	1	2	7	54	21	6	43	38	24
10	2	1	2	10	70	23	25	42	28	22
1	3	1	2	2	78	14	27	8	19	6
2	3	1	2	3	45	23	21	5	7	10
3	3	1	2	2	53	19	33	7	8	4
4	3	1	2	0	62	21	22	11	10	4
5	3	1	2	14	37	12	12	6	5	5
6	3	1	2	2	90	25	17	4	5	7
7	3	1	2	2	44	15	28	6	9	6
8	3	1	2	1	70	18	38	4	9	10
9	3	1	2	2	121	12	23	3	7	5
10	3	1	2	1	49	12	13	7	5	13
1	4	1	2	1	30	9	5	1	3	4
2	4	1	2	2	42	19	1	4	3	3
3	4	1	2	0	69	18	2	2	0	0
4	4	1	2	0	20	20	2	0	0	0
5	4	1	2	0	2	14	2	2	12	12
6	4	1	2	1	78	25	2	16	0	0
7	4	1	2	1	43	15	3	2	0	0
8	4	1	2	0	51	16	36	0	2	2
9	4	1	2	2	56	13	28	2	1	1
10	4	1	2	3	73	12	6	3	1	2

LAMPIRAN 3D
 Data EMCA hasil bacaan drWBM Taib Saleh
 DAERAH PARAKORTEKS
 No Kel Group Peneliti CD4_2 CD8_2 Mo_2 IFN_2 IgG_2 IgA_2 IgM_2

1	1	2	2	9	9	18	12	15	8	6
2	1	2	2	8	14	28	11	6	7	8
3	1	2	2	10	45	29	12	10	13	10
4	1	2	2	16	37	27	9	8	10	7
5	1	2	2	10	20	35	12	7	9	8
6	1	2	2	10	17	27	22	5	10	4
7	1	2	2	16	47	34	7	8	14	7
8	1	2	2	12	40	28	9	10	15	9
9	1	2	2	9	32	28	15	4	11	6
10	1	2	2	11	25	35	15	9	13	7
1	2	2	2	5	37	28	5	6	16	9
2	2	2	2	25	71	41	5	8	27	9
3	2	2	2	10	44	30	4	6	30	12
4	2	2	2	7	21	28	6	11	16	9
5	2	2	2	11	60	28	8	8	24	5
6	2	2	2	18	46	35	14	26	42	15
7	2	2	2	11	34	35	11	13	48	20
8	2	2	2	14	45	35	8	33	76	7
9	2	2	2	15	38	29	18	33	20	18
10	2	2	2	14	29	27	14	23	12	16
1	3	2	2	8	10	20	16	12	11	14
2	3	2	2	8	33	27	34	14	15	10
3	3	2	2	6	28	23	10	16	11	13
4	3	2	2	4	24	28	9	19	11	13
5	3	2	2	7	15	29	6	14	12	12
6	3	2	2	7	30	28	10	14	12	10
7	3	2	2	2	17	27	9	10	12	12
8	3	2	2	4	31	26	11	11	14	14
9	3	2	2	5	33	25	15	12	13	10
10	3	2	2	6	15	28	15	9	18	14
1	4	2	2	1	30	9	5	1	3	4
2	4	2	2	2	42	19	1	4	3	3
3	4	2	2	0	69	18	2	2	0	0
4	4	2	2	0	20	20	2	0	0	0
5	4	2	2	0	2	14	2	2	12	12
6	4	2	2	1	78	25	2	16	0	0
7	4	2	2	1	43	15	3	2	0	0
8	4	2	2	0	51	16	36	0	2	2
9	4	2	2	2	56	13	28	2	1	1
10	4	2	2	3	73	12	6	3	1	2

PENJELASAN:

Group 1 = FTECA (fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica*)

Group 2 = EMCA (ekstrak metanol *Centella asiatica*)

Kelompok 1 = mendapat perlakuan 187,50 µg per 100 gram BB tikus.

Kelompok 2 = mendapat perlakuan 375,0 µg per 100 gram BB tikus.

Kelompok 3 = mendapat perlakuan 750,0 µg per 100 gram BB tikus.

Kelompok 4 = plasebo mendapat 1,5 ml larutan garam faali.

PETUNJUK UNTUK VARIABEL

1 pada variabel = menunjukkan daerah jerminal senter

2 pada variabel = menunjukkan daerah parakorteks

PETUNUK UNTUK PENELITI
 1. Peneliti 1 : dr WBM Taib Saleh
 2. Peneliti 2 : DR dr Watadianto

LAMPIRAN 4 s/d LAMPIRAN 12
 ANALISIS STATISTIK

LAMPIRAN 4
 ANALISIS STATISTIK UNTUK UJI NORMALITAS BERAT BADAN TIKUS BERDASARKAN
 PENGELOMPOKAN VARIABEL

-----ONE WAY-----

Variable BERAT
 By Variable KEL

		Analysis of Variance			
Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between	6	316.1905	52.6984	1.2219	.3016
Within	98	4226.6667	43.1293		
Total	104	4542.8571			

Group	Count	Mean	Deviation	Standard Error	Standard Minimum	Standard Maximum	95 Pct Cont	Int for Mean
Grp 1	15	105.6667	7.2866	1.8814	95.0000	120.0000	101.6315 To	109.7019
Grp 2	15	105.0000	6.5465	1.6903	95.0000	115.0000	101.3746 To	108.6254
Grp 3	15	110.0000	7.0711	1.8257	95.0000	120.0000	106.0842 To	113.9158
Grp 4	15	108.0000	7.7460	2.0000	95.0000	120.0000	103.7104 To	112.2896
Grp 5	15	106.0000	6.3246	1.6330	95.0000	115.0000	102.4976 To	109.5024
Grp 6	15	109.0000	5.7321	1.4800	100.0000	120.0000	105.8257 To	112.1743
Grp 7	15	106.3333	4.8058	1.2408	100.0000	115.0000	103.6720 To	108.9947
Total	105	107.1429	6.6092	.6450	95.0000	120.0000	105.8638 To	108.4219
Fixed Effects Model			6.5673	.6409			105.8710 To	108.4147
Random Effects Model				.7084			105.4094 To	108.8763
Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance								.6379

Tests for Homogeneity of variance
 Cochran's C = Max. Variance / Sum (Variances) = .1987, P = .934 (Approx.)
 Bartlett-Bax F = .664, P = .679
 Maximum Variance / Minimum Variance 2.598

Tukey-HSD Procedure
 Ranges for the .050 level
 4.26 4.26 4.26 4.26 4.26 4.26

The ranges above are table ranges,
 The value actually compared with Mean (J) - Mean (I) is ..
 5.6438 x range X 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).

EMCA

Variable BERAT
 by Variable KEL

-----one way-----

Analysis of Variance									
				Sum of	Mean	F		F	
Source		D.F.	Squares	Squares	Ratio	Prob.			
Between	group	3	90.0000	30.0000	.7695	.5160			
Within	group	56	2183.3333	38.9881					
Total		59	2273.3333						

Standard Standard									
Group	Count	Mean	Deviation	Error	Minimum	Maximum	95 Pct Cont	Int for Mean	
Grp 1	15	108.0000	7.7460	2.0000	95.0000	120.0000	103.7104 To	112.2896	
Grp 5	15	106.0000	6.3246	1.6330	95.0000	115.0000	102.4976 To	109.5024	
Grp 6	15	109.0000	5.7321	1.4800	100.0000	120.0000	105.8257 To	112.1743	
Grp 7	15	106.3333	4.8058	2.2408	100.0000	115.0000	103.6720 To	108.9947	
Total	60	107.3333	6.2073	.8014	95.0000	120.0000	105.7298 To	108.9396	

Fixed Effects Model	6.2440	.8061	105.7185 To	108.9482
Random Effects Model		.8061	104.7680 To	109.8987
Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance			1.7897	

Tests for Homogeneity of variance

Cochrans C = Max. Variance / Sum (Variances) = .3847, P = .234 (Approx.)

Bartlett-Bax F = 1.079, P = .357

Maximum Variance / Minimum Variance 2.598

Tukey-HSD Procedure

Ranges for the .050 level -

3.74 3.74 3.74

The ranges above are table ranges,

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

$4.4152 \times \text{range} \times \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$

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)

FTECA

one way

Variable BERAT
by Variable KEL

Analysis of Variance									
				Sum of	Mean	F		F	
Source		D.F.	Squares	Squares	Ratio	Prob.			
Between	group	3	253.0000	78.3333	1.5214	.2190			
Within	group	56	2883.3333	51.4881					
Total		59	3118.3333						

Standard Standard									
Group	Count	Mean	Deviation	Error	Minimum	Maximum	95 Pct Cont	Int for Mean	
Grp 1	15	105.6667	7.2866	1.8814	95.0000	120.0000	101.6315 To	109.7019	
Grp 2	15	105.0000	6.5465	1.6903	95.0000	115.0000	101.3746 To	108.6254	
Grp 3	15	110.0000	7.0711	1.8257	95.0000	120.0000	106.0842 To	113.9158	
Grp 4	15	108.0000	7.7460	2.0000	95.0000	120.0000	103.7104 To	112.2896	
Total	60	107.1667	7.2700	.9386	95.0000	120.0000	105.2886 To	109.0447	

Fixed Effects Model	7.1755	.9264	105.3110 To	109.0224
Random Effects Model		1.1426	103.5304 To	110.8029

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance 1.7897

Tests for Homogeneity of variance

Cochrans C = Max. Variance / Sum (Variances) = .2913, P = 1.000 (Approx.)

Bartlett-Bax F = .132, P = .941

Maximum Variance / Minimum Variance 1.400

Tukey-HSD Procedure

Ranges for the .050 level -

3.74 3.74 3.74

The ranges above are table ranges,

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

5.0739 x range X 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)

LAMPIRAN 5

HASIL PENGAMATAN PENELITI DAN PENDAMPING UNTUK 7 VARIABEL
DAERAH PARAKORTEKS KELOMPOK VI, VII DAN VIII EMCA

title 'UJI ANTAR 2 PENGAMAT DARI DATA FMECA PADA PARAKORTEKS'.

MAN CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 BY PENELITI(1,2)

kel(1,4)/pri cell(all)/prihomo(all)/pri signif.all/disc/desig.

80 cases accepted.

0 cases rejected because of out-of-range factor values.

0 cases rejected because of missing data.

8 non-empty cells.

1 design will be processed.

CELL NUMBER								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Variable								
PENELITI	1	1	1	1	2	2	2	2
KEL	1	2	3	4	1	2	3	4

Cell Means and Standard Deviations

Variable .. CD4_2

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI	KE-2					
KEL	187.5	11.000	3.464	10	8.522	13.478
KEL	375	12.900	6.773	10	8.055	17.745
KEL	750	5.500	2.273	10	3.874	7.126
KEL	KONTROL	1.000	1.247	10	.108	1.892
PENELITI	KE-1					
KEL	187.5	11.100	2.807	10	9.092	13.108
KEL	375	13.000	5.696	10	8.925	17.075
KEL	750	5.700	1.947	10	4.308	7.092
KEL	KONTROL	1.000	1.054	10	.246	1.754
For entire sample		7.650	5.900	80	6.337	8.963

Variable .. CD8_2

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf.Interval	
PENELITI KE-2						
KEL	187.5	27.800	13.742	10	17.970	37.630
KEL	375	41.800	14.274	10	31.589	52.011
KEL	750	23.500	8.797	10	17.207	29.793
KEL	KONTROL	46.100	24.736	10	28.405	63.795
PENELITI KE-1						
KEL	187.5	28.600	13.492	10	18.948	38.252
KEL	375	42.500	14.554	10	32.088	52.912
KEL	750	23.600	8.618	10	17.435	29.765
KEL	KONTROL	46.400	24.263	10	29.043	63.757
For entire sample						
		35.037	18.265	80	30.973	39.102

Variable .. MO_2

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf.Interval	
PENELITI KE-2						
KEL	187.5	28.700	5.208	10	24.974	32.426
KEL	375	32.100	4.864	10	28.621	35.579
KEL	750	25.900	3.213	10	23.602	28.198
KEL	KONTROL	15.900	4.654	10	12.571	19.229
PENELITI KE-1						
KEL	187.5	28.900	5.043	10	25.292	32.508
KEL	375	31.600	4.624	10	28.292	34.908
KEL	750	26.100	2.767	10	24.121	28.079
KEL	KONTROL	16.100	4.581	10	12.823	19.377
For entire sample						
		25.663	7.341	80	24.029	27.296

Variable .. IFN_2

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf.Interval	
PENELITI KE-2						
KEL	187.5	12.400	5.060	10	8.781	16.019
KEL	375	8.900	5.131	10	5.230	12.570
KEL	750	13.400	8.343	10	7.432	19.368
KEL	KONTROL	8.500	13.109	10	-.877	17.877
PENELITI KE-1						
KEL	187.5	12.400	4.222	10	9.380	15.420
KEL	375	9.300	4.739	10	5.910	12.690
KEL	750	13.500	7.878	10	7.865	19.135
KEL	KONTROL	8.700	12.517	10	-.254	17.654
For entire sample						
		10.887	8.205	80	9.062	12.713

Variable .. IGG_2

FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent Conf.Interval	
PENELITI KE-2						
KEL	187.5	7.300	2.983	10	5.166	9.434
KEL	375	28.800	18.582	10	15.507	42.093
KEL	750	12.300	4.398	10	9.154	15.446
KEL	KONTROL	3.200	4.662	10	-.135	6.535
PENELITI KE-1						
KEL	187.5	8.200	3.120	10	5.968	10.432
KEL	375	16.700	10.975	10	8.849	24.551
KEL	750	13.100	2.961	10	10.982	15.218
KEL	KONTROL	3.200	4.662	10	-.135	6.535
For entire sample						
		11.600	11.229	80	9.101	14.099

Variable .. IGA_2

FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent Conf.Interval	
PENELITI KE-2						
KEL	187.5	10.700	2.359	10	9.012	12.388

KEL 375	30.100	20.273	10	15.598	44.602
KEL 750	10.200	3.259	10	7.869	12.531
KEL KONTROL	2.200	3.645	10	-.408	4.808
PENELITI KE-1					
KEL 187.5	11.000	2.667	10	9.092	12.908
KEL 375	31.100	19.530	10	17.129	45.071
KEL 750	12.900	2.234	10	11.302	14.498
KEL KONTROL	2.200	3.645	10	-.408	4.808
For entire sample	13.800	14.355	80	10.605	16.995

Variable .. IGM_2

FACTOR CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent Conf.Interval	
PENELITI KE-2					
KEL 187.5	7.100	1.969	10	5.691	8.509
KEL 375	13.300	5.579	10	9.309	17.291
KEL 750	11.500	2.273	10	9.874	13.126
KEL KONTROL	2.200	3.645	10	-.408	4.808
PENELITI KE-1					
KEL 187.5	7.200	1.687	10	5.994	8.406
KEL 375	12.000	5.011	10	8.415	15.585
KEL 750	12.200	1.687	10	10.994	13.406
KEL KONTROL	2.400	3.658	10	-.216	5.016
For entire sample	8.487	5.353	80	7.296	9.679

*****ANALYSIS OF VARIANCE – DESIGN 1*****

EFFECT .. PENELITI BY KEL

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = 1 1/2, N = 32)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	Error DF	Sig.of F
Pillais	.16743	.57419	21.00	204.00	.933
Hotellings	.19918	.61333	21.00	194.00	.906
Wilks	.83330	.59344	21.00	190.07	.920
Roys	.16297				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	.19470	97.75363	97.75363	.40370
2	.00426	2.13699	99.89062	.06510
3	.00022	.10938	100.00000	.01476

Dimension Reduction Analysis

Roots	Wilks L.	F	Hypoth.DF	ErrorDF	Sig.of F
1 TO 3	.83330	.59344	21.00	190.07	.920
2 TO 3	.99554	.02496	12.00	134.00	1.000
3 TO 3	.99978	.00296	5.00	68.00	1.000

Univariate F-tests with (3,72) D. F.

Variable	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
CD4_2	.10000	988.40000	.03333	13.72778	.00243	1.000
CD8_2	1.63750	19248.30000	.54583	267.33750	.00204	1.000
MO_2	1.83750	1423.90000	.61250	19.77639	.03097	.993
IFN_2	.43750	4971.30000	.14583	69.04583	.00211	1.000
IGG_2	604.10000	5003.60000	201.36667	69.49444	2.89759	.041
IGA_2	21.90000	7625.60000	7.30000	105.91111	.06893	.976
IGM_2	11.03750	878.70000	3.67917	12.20417	.30147	.824

Averaged F-test with (21,504) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
-----------	-----------	---------	-----------	---------	---	----------

1to7 641.05000 0139.80000 30.52619 79.64246 38329 .995

*****ANALYSIS OF VARIANCE – DESIGN 1*****

EFFECT .. KEL

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = 1 1/2, N = 32)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	Error DF	Sig.of F
Pillais	1.68399	12.43055	21.00	204.00	.000
Hotellings	7.00008	21.55581	21.00	194.00	.000
Wilks	.05118	16.43253	21.00	190.07	.000
Roys	.84644				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum.Pct.	Canon Cor.
1	5.51209	78.74325	78.74325	.92002
2	.94641	13.51992	92.26317	.69730
3	.54158	7.73683	100.00000	.59272

Dimension Reduction Analysis

Roots	Wilks L.	F	Hypoth.DF	Error DF	Sig. of F
1 TO 3	.05118	16.43253	21.00	190.07	.000
2 TO 3	.33327	8.17634	12.00	134.00	.000
3 TO 3	.64868	7.36555	5.00	68.00	.000

Univariate F-tests with (3,72) D. F.

Variable	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
CD4_2	1761.50000	988.40000	587.16667	13.72778	42.77216	.000
CD8_2	7100.43750	19248.30000	2366.81250	267.33750	8.85328	.000
MO_2	2832.13750	1423.90000	944.04583	19.77639	47.73601	.000
IFN_2	345.63750	4971.30000	115.21250	69.04583	1.66864	.181
IGG_2	4218.30000	5003.60000	1406.10000	69.49444	20.23327	.000
IGA_2	8611.30000	7625.60000	2870.43333	105.91111	27.10229	.000
IGM_2	1374.13750	878.70000	458.04583	12.20417	37.53192	.000

Averaged F-test with (21,504) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	Error MS	F	Sig.of F
1 to 7	26243.45000	40139.80000	1249.68810	79.64246	15.69123	.000

*****ANALYSIS OF VARIANCE – DESIGN 1*****

EFFECT .. PENELITI

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 2 1/2, N = 32)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	Error DF	Sig.of F
Pillais	.05427	.54109	7.00	66.00	.800
Hotellings	.05739	.54109	7.00	66.00	.800
Wilks	.94573	.54109	7.00	66.00	.800
Roys	.05427				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	.05739	100.00000	100.00000	.23297

Univariate F-tests with (1,72) D. F.

Variable	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
CD4_2	.20000	988.40000	.20000	13.72778	.01457	.904
CD8_2	4.51250	19248.30000	4.51250	267.33750	.01688	.897
MO_2	.01250	1423.90000	.01250	19.77639	.00063	.980
IFN_2	.612504	971.30000	.61250	69.04583	.00887	.925

IGG_2	135.20000	5003.60000	135.20000	69.49444	1.94548	.167
IGA_2	20.00000	7625.60000	20.00000	105.91111	.18884	.665
IGM_2	.11250	878.70000	.11250	12.20417	.00922	.924

Averaged F-test with (7,504) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
1 to 7	160.65000	40139.80000	22.95000	79.64246	.28816	.959

LAMPIRAN 6

HASIL PENGAMATAN PENELITI DAN PENDAMPING UNTUK 7 VARIABEL DAERAH PARAKORTEKS KELOMPOK IX, X DAN XI FTECA

title 'UJI ANTAR 2 PENGAMAT DARI DATA FTECA PADA PARAKORTEKS':

MAN CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 BY PENELITI(1,2) kel(1,4) /pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/desig.

80 cases accepted.

0 cases rejected because of out-of-range factor values.

0 cases rejected because of missing data.

8 non-empty cells

1 design will be processed.

CELL NUMBER

1 2 3 4 5 6 7 8

Variable

PENELITI 1 1 1 1 2 2 2 2

KEL 1 2 3 4 1 2 3 4

Cell Means and Standard Deviations

Variable .. CD4_2

FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI KE-2						
KEL	187.5	15.100	13.691	10	5.306	24.894
KEL	375	6.200	2.898	10	4.127	8.273
KEL	750	2.400	4.195	10	-.601	5.401
KEL	KONTROL	1.000	1.247	10	.108	1.892
PENELITI KE-1						
KEL	187.5	15.300	13.475	10	5.661	24.939
KEL	375	6.100	2.424	10	4.366	7.834
KEL	750	2.900	3.985	10	.050	5.750
KEL	KONTROL	1.000	1.054	10	.246	1.754
For entire sample		6.250	8.851	80	4.280	8.220

Variable .. CD8_2

FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI KE-2						
KEL	187.5	152.100	52.590	10	114.480	189.720
KEL	375	101.300	54.125	10	62.581	140.019
KEL	750	64.700	25.880	10	46.186	83.214
KEL	KONTROL	46.100	24.736	10	28.405	63.795
PENELITI KE-1						
KEL	187.5	153.500	52.960	10	115.615	191.385
KEL	375	102.200	54.997	10	62.858	141.542
KEL	750	64.900	25.796	10	46.447	83.353
KEL	KONTROL	46.400	24.263	10	29.043	63.757
For entire sample		91.400	57.260	80	78.657	104.143

Variable .. MO_2

FACTOR CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI KE-2					
KEL 187.5	38.000	10.252	10	30.666	45.334
KEL 375	22.100	3.414	10	19.658	24.542
KEL 750	18.500	6.364	10	13.947	23.053
KEL KONTROL	15.900	4.654	10	12.571	19.229
PENELITI KE-1					
KEL 187.5	37.900	10.005	10	30.743	45.057
KEL 375	21.900	2.923	10	19.809	23.991
KEL 750	17.100	4.818	10	13.654	20.546
KEL KONTROL	16.100	4.581	10	12.823	19.377
For entire sample	23.438	10.669	80	21.063	25.812

Variable .. IFN_2

FACTOR CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI KE-2					
KEL 187.5	7.700	3.057	10	5.513	9.887
KEL 375	6.800	7.068	10	1.744	11.856
KEL 750	23.100	8.266	10	17.187	29.013
KEL KONTROL	8.500	13.109	10	-877	17.877
PENELITI KE-1					
KEL 187.5	7.800	2.530	10	5.990	9.610
KEL 375	7.000	6.912	10	2.055	11.945
KEL 750	23.400	8.343	10	17.432	29.368
KEL KONTROL	8.700	12.517	10	-.254	17.654
For entire sample	11.625	10.586	80	9.269	13.981

Variable .. IGG_2

FACTOR CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI KE-2					
KEL 187.5	13.200	2.201	10	11.625	14.775
KEL 375	40.300	9.105	10	33.787	46.813
KEL 750	5.800	2.486	10	4.022	7.578
KEL KONTROL	3.200	4.662	10	-.135	6.535
PENELITI KE-1					
KEL 187.5	13.400	1.955	10	12.001	14.799
KEL 375	40.500	9.301	10	33.847	47.153
KEL 750	6.100	2.331	10	4.433	7.767
KEL KONTROL	3.200	4.662	10	-.135	6.535
For entire sample	15.712	15.688	80	12.221	19.204

Variable .. IGA_2

FACTOR CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI KE-2					
KEL 187.5	12.800	2.251	10	11.190	14.410
KEL 375	32.300	5.794	10	28.155	36.445
KEL 750	8.100	4.228	10	5.075	11.125
KEL KONTROL	2.200	3.882	10	-.577	4.977
PENELITI KE-1					
KEL 187.5	12.800	2.440	10	11.054	14.546
KEL 375	32.700	5.250	10	28.944	36.456
KEL 750	8.400	4.142	10	5.437	11.363
KEL KONTROL	2.200	3.645	10	-.408	4.808
For entire sample	13.937	12.087	80	11.248	16.627

Variable .. IGM_2

FACTOR CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
PENELITI KE-2					
KEL 187.5	12.400	2.914	10	10.316	14.484
KEL 375	23.000	2.981	10	20.867	25.133

KEL 750	6.700	3.234	10	4.387	9.013
KEL KONTROL	2.200	3.645	10	-408	4.808
PENELITI KE-1					
KEL 187.5	12.500	3.100	10	10.282	14.718
KEL 375	23.500	3.136	10	21.257	25.743
KEL 750	7.000	3.018	10	4.841	9.159
KEL KONTROL	2.400	3.658	10	-216	5.016
For entire sample	11.213	8.455	80	9.331	13.094

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

EFFECT .. PENELITI BY KEL

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = 1 1/2, N = 32)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	Error DF	Sig.of F
Pillais	.00396	.01284	21.00	204.00	1.000
Hotellings	.00397	.01222	21.00	194.00	1.000
Wilks	.99604	.01250	21.00	190.07	1.000
Roys	.00283				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	.00284	71.51539	71.51539	.05320
2	.00105	26.51334	98.02873	.03242
3	.00008	1.97127	100.00000	.00884

Dimension Reduction Analysis

Roots	Wilks L.	F	Hypoth.DF	Error DF	Sig. of F
1 TO 3	.99604	.01250	21.00	190.07	1.000
2 TO 3	.99887	.00631	12.00	134.00	1.000
3 TO 3	.99992	.00106	5.00	68.00	1.000

Univariate F-tests with (3,72) D. F.

Variable	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
CD4_2	1.05000	3774.80000	.35000	52.42778	.00668	.999
CD8_2	4.70000	126543.400	1.56667	1757.54722	.00089	1.000
MO_2	7.43750	2985.90000	2.47917	41.47083	.05978	.981
IFN_2	.10000	5219.20000	.03333	72.48889	.00046	1.000
IGG_2	.23750	2098.30000	.07917	29.14306	.00272	1.000
IGA_2	.63750	1219.90000	.21250	16.94306	.01254	.998
IGM_2	.43750	747.50000	.14583	10.38194	.01405	.998

Averaged F-test with (21,504) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
1 to 7	14.60000	142589.00000	.69524	282.91468	.00246	1.000

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

EFFECT .. KEL

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = 1 1/2, N = 32)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	Error DF	Sig.of F
Pillais	2.16831	25.32610	21.00	204.00	.000
Hotellings	27.91775	85.96893	21.00	194.00	.000
Wilks	.00457	50.03789	21.00	190.07	.000
Roys	.95764				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum.Pct.	Canon Cor.
----------	------------	------	----------	------------

1	22.60759	80.97927	80.97927	.97859
2	4.67954	16.76188	97.74115	.90771
3	.63062	2.25885	100.00000	.62188

Dimension Reduction Analysis

Roots	Wilks L.	F	Hypoth.DF	Error DF	Sig.of F
1 TO 3	.00457	50.03789	21.00	190.07	.000
2 TO 3	.10798	22.81593	12.00	134.00	.000
3 TO 3	.61326	8.57643	5.00	68.00	.000

Univariate F-tests with (3,72) D. F.

Variable	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
CD4_2	2412.70000	3774.80000	804.23333	52.42778	15.33983	.000
CD8_2	132463.300	126543.400	44154.4333	1757.54722	25.12276	.000
MO_2	5995.53750	2985.90000	1998.51250	41.47083	48.19080	.000
IFN_2	3632.65000	5219.20000	1210.88333	72.48889	16.70440	.000
IGG_2	17343.2375	2098.30000	5781.07917	29.14306	198.36901	.000
IGA_2	10319.5375	1219.90000	3439.84583	16.94306	203.02394	.000
IGM_2	4897.93750	747.50000	1632.64583	10.38194	157.25819	.000

Averaged F-test with (21,504) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
1 to 7	177064.90000	142589.00000	8431.66190	282.91468	29.80284	.000

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

EFFECT .. PENELITI

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 2 1/2, N = 32)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	ErrorDF	Sig.of F
Pillais	.00453	.04291	7.00	66.00	1.000
Hotellings	.00455	.04291	7.00	66.00	1.000
Wilks	.99547	.04291	7.00	66.00	1.000
Roys	.00453				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum.Pct.	Canon Cor.
1	.00455	100.00000	100.00000	.06731

Univariate F-tests with (1,72) D. F.

Variable	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
CD4_2	.45000	3774.80000	.45000	52.42778	.00858	.926
CD8_2	9.80000	126543.400	9.80000	1757.54722	.00558	.941
MO_2	2.81250	2985.90000	2.81250	41.47083	.06782	.795
IFN_2	.80000	5219.20000	.80000	72.48889	.01104	.917
IGG_2	.61250	2098.30000	.61250	29.14306	.02102	.885
IGA_2	.61250	1219.90000	.61250	16.94306	.03615	.850
IGM_2	1.51250	747.50000	1.51250	10.38194	.14569	.704

Averaged F-test with (7,504) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	Error MS	F	Sig.of F
1 to 7	16.60000	142589.00000	2.37143	282.91468	.00838	1.000

LAMPIRAN 7

title 'UJI PERBEDAAN ANTAR 4 KELOMPOK PADA EMCA PARAKORTEKS'.

PRO IF (GROUP=2).

MAN CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 BY kel(1,4)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/desig.

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

 CELL NUMBER
 1 2 3 4
 Variable
 KEL 1 2 3 4
 Cell Means and Standard Deviations

Variable .. CD4_2

FACTOR CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
KEL 187.5	11.100	2.807	10	9.092	13.108
KEL 375	13.000	5.696	10	8.925	17.075
KEL 750	5.700	1.947	10	4.308	7.092
KEL KONTROL	1.000	1.054	10	.246	1.754
For entire sample	7.700	5.757	40	5.859	9.541

Variable .. CD8_2

FACTOR CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
KEL 187.5	28.600	13.492	10	18.948	38.252
KEL 375	42.500	14.554	10	32.088	52.912
KEL 750	23.600	8.618	10	17.435	29.765
KEL KONTROL	46.400	24.263	10	29.043	63.757
For entire sample	35.275	18.313	40	29.418	41.132

Variable .. MO_2

FACTOR CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
KEL 187.5	28.900	5.043	10	25.292	32.508
KEL 375	31.600	4.624	10	28.292	34.908
KEL 750	26.100	2.767	10	24.121	28.079
KEL KONTROL	16.100	4.581	10	12.823	19.377
For entire sample	25.675	7.255	40	23.355	27.995

Variable .. IFN_2

FACTOR CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
KEL 187.5	12.400	4.222	10	9.380	15.420
KEL 375	9.300	4.739	10	5.910	12.690
KEL 750	13.500	7.878	10	7.865	19.135
KEL KONTROL	8.700	12.517	10	-.254	17.654
For entire sample	10.975	7.998	40	8.417	13.533

Variable .. IGG_2

FACTOR CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL 187.5	8.200	3.120	10	5.968	10.432
KEL 375	16.700	10.975	10	8.849	24.551
KEL 750	13.100	2.961	10	10.982	15.218
KEL KONTROL	3.200	4.662	10	-.135	6.535
For entire sample	10.300	7.978	40	7.748	12.852

Variable .. IGA_2

FACTOR CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
-------------	------	-----------	---	------------	----------------

KEL	187.5	11.000	2.667	10	9.092	12.908
KEL	375	31.100	19.530	10	17.129	45.071
KEL	750	12.900	2.234	10	11.302	14.498
KEL KONTROL	2.200	3.645	10	-.408	4.808	
For entire sample	14.300	14.391	40	9.698	18.902	

Variable ..IGM_2

FACTOR CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL 187.5	7.200	1.687	10	5.994	8.406
KEL 375	12.000	5.011	10	8.415	15.585
KEL 750	12.200	1.687	10	10.994	13.406
KEL KONTROL	2.400	3.658	10	-.216	5.016
For entire sample	8.450	5.179	40	6.794	10.106

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

EFFECT .. KEL

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = 1 1/2, N = 14)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	1.80202	6.87643	21.00	96.00	.000
Hotellings	6.82195	9.31251	21.00	86.00	.000
Wilks	.04442	8.08302	21.00	86.69	.000
Roys	.83034				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	4.89428	71.74313	71.74313	.91123
2	1.15660	16.95403	88.69716	.73233
3	.77107	11.30284	100.00000	.65983

Dimension Reduction Analysis

Roots	Wilks L.	F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
1 TO 3	.04442	8.08302	21.00	86.69	.000
2 TO 3	.26181	4.93082	12.00	62.00	.000
3 TO 3	.56463	4.93488	5.00	32.00	.002

Univariate F-tests with (3,36) D. F.

Variable	Hypoth.SS	Error SS	Hypoth.MS	Error MS	F	Sig. of F
CD4_2	885.40000	407.00000	295.13333	11.30556	26.10516	.000
CD8_2	3568.27500	9511.70000	1189.42500	264.21389	4.50175	.009
MO_2	1373.67500	679.10000	457.89167	18.86389	24.27345	.000
IFN_2	163.87500	2331.10000	54.62500	64.75278	.84359	.479
IGG_2	1036.20000	1446.20000	345.40000	40.17222	8.59798	.000
IGA_2	4415.00000	3661.40000	1471.66667	101.70556	14.46987	.000
IGM_2	648.30000	397.60000	216.10000	11.04444	19.56640	.000

Averaged F-test with (21,252) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig. of F
1 to 7	12090.72500	18434.10000	575.74881	73.15119	7.87067	.000

PRO IF (GROUP=2).
dsc group KEL(1,4)/VAR CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 /met
rao/PIN=0.5/POUT=0.5/ana all/stat all.

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

On groups defined by KEL
40 (unweighted) cases were processed.

0 of these were excluded from the analysis.
 40 (unweighted) cases will be used in the analysis.
 Number of Cases by Group

KEL	Number of Cases		Label
	Unweighted	Weighted	
1	10	10.0	187.5
2	10	10.0	375
3	10	10.0	750
4	10	10.0	KONTROL
Total	40	40.0	

Group Means

KEL	CD4_2	CD8_2	MO_2	IFN_2	IGG_2	IGA_2	IGM_2
1	11.10000	28.60000	28.90000	12.40000	8.20000	11.00000	7.20000
2	13.00000	42.50000	31.60000	9.30000	16.70000	31.10000	12.00000
3	5.70000	23.60000	26.10000	13.50000	13.10000	12.90000	12.20000
4	1.00000	46.40000	16.10000	8.70000	3.20000	2.20000	2.40000
Total	7.70000	35.27500	25.67500	10.97500	10.30000	14.30000	8.45000

Group Standard Deviations

KEL	CD4_2	CD8_2	MO_2	IFN_2	IGG_2	IGA_2	IGM_2
1	2.80674	13.49238	5.04315	4.22164	3.11983	2.66667	1.68655
2	5.69600	14.55450	4.62361	4.73873	10.97522	19.53032	5.01110
3	1.94651	8.61781	2.76687	7.87753	2.96086	2.23358	1.68655
4	1.05409	24.26337	4.58136	12.51710	4.66190	3.64539	3.65756
Tot.	5.75660	18.31349	7.25502	7.99836	7.97818	14.39052	5.17860

Wilks' Lambda (U-statistic) and univariate F-ratio
 with 3 and 36 degrees of freedom

Variable	Wilks' Lambda	F	Significance
CD4_2	.31492	26.11	.0000
CD8_2	.72720	4.502	.0088
MO_2	.33082	24.27	.0000
IFN_2	.93432	.8436	.4791
IGG_2	.58258	8.598	.0002
IGA_2	.45335	14.47	.0000
IGM_2	.38015	19.57	.0000

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

On groups defined by KEL
 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..... 3
 Minimum cumulative percent of variance... 100.00
 Maximum significance of Wilks' Lambda... 1.0000
 Prior probability for each group is .25000

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD4_2	1.0000000	1.0000000	.0000	78.31548
CD8_2	1.0000000	1.0000000	.0088	13.50525
MO_2	1.0000000	1.0000000	.0000	72.82035
IFN_2	1.0000000	1.0000000	.4791	2.530779
IGG_2	1.0000000	1.0000000	.0002	25.79394
IGA_2	1.0000000	1.0000000	.0000	43.40962
IGM_2	1.0000000	1.0000000	.0000	58.69920

At step 1, CD4_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.31492 1 3 36.0	
Equivalent F	26.1052 3 36.0	.0000
RAO'S V	78.31548 3	.0000 (APPROX.)

————— Variables in the analysis after step 1 —————

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	1.0000000	.0000	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD8_2	.8312728	.8312728	.0006	116.8935
MO_2	.8660687	.8660687	.0049	113.3562
IFN_2	.9948206	.9948206	.4929	80.93777
IGG_2	.9366507	.9366507	.0086	93.81322
IGA_2	.9636628	.9636628	.0016	107.4505
IGM_2	.9974283	.9974283	.0000	133.0364

F statistics and significances between pairs of groups after step 1
Each F statistic has 1 and 36.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group 2 375	1.5966		
	.2145		
3 750	12.896	23.568	
	.0010	.0000	
4 KONTROL	45.115	63.686	9.7695
	.0000	.0000	.0035

At step 2, IGM_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.14603 2 3 36.0	
Equivalent F	18.8634 6 70.0	.0000
RAO'S V	133.0364 6	.0000 (APPROX.)

————— Variables in the analysis after step 2 —————

Signif. of

Variable	Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.9974283	.0000	
IGM_2	.9974283	.0000	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD8_2	.6470961	.6470961	.0022	158.5807
MO_2	.8556214	.8556214	.0184	177.5966
IFN_2	.9946120	.9923783	.5516	
IGG_2	.9010353	.9010353	.2750	140.3823
IGA_2	.9596075	.9596075	.0106	158.6027

F statistics and significances between pairs of groups after step 2
Each F statistic has 2 and 35.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group 2 375	5.6599		
	.0074		
3 750	12.398	11.527	
	.0001	.0001	
4 KONTROL	25.999	48.824	24.933
	.0000	.0000	.0000

At step 3, MO_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.10920 3 3 36.0	
Approximate F	13.6705 9 82.9	.0000
RAO'S V	177.5966 9	.0000 (APPROX.)

————— Variables in the analysis after step 3 —————

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.8594162	.0026	
MO_2	.8556214	.0184	
IGM_2	.9853964	.0000	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD8_2	.6140973	.6140973	.0012	215.7745
IFN_2	.9559359	.8223501	.4284	182.3835
IGG_2	.9005336	.8170406	.3055	184.5093
IGA_2	.8886409	.7923450	.0134	194.9896

F statistics and significances between pairs of groups after step 3
Each F statistic has 3 and 34.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group 2 375	4.2418		
	.0119		

3 750	8.0498	7.8451	
	.0003	.0004	
4 KONTROL	24.050	43.486	24.147
	.0000	.0000	.0000

At step 4, CD8_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.06797 4 3 36.0	
Approximate F	12.8680 12 87.6	.0000
RAO'S V	215.7745 12	.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.7276798	.0006	
CD8_2	.6140973	.0012	
MO_2	.8119888	.0095	
IGM_2	.7763748	.0001	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
IFN_2	.9492153	.6097799	.4256	222.4833
IGG_2	.8969600	.6116603	.4639	222.4045
IGA_2	.8817790	.6093554	.0225	234.6517

F statistics and significances between pairs of groups after step 4
Each F statistic has 4 and 33.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group 2 375	5.4344		
	.0018		
3 750	7.7741	5.7328	
	.0002	.0013	
4 KONTROL	26.233	33.678	20.044
	.0000	.0000	.0000

At step 5, IGA_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.05061 5 3 36.0	
Approximate F	11.5181 15 88.7	.0000
RAO'S V	234.6517 15	.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.7193415	.0008	
CD8_2	.6093554	.0022	
MO_2	.7464610	.0108	
IGA_2	.8817790	.0225	
IGM_2	.7746738	.0006	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
IFN_2	.9473674	.6046959	.4549	241.7938
IGG_2	.8117912	.6039556	.6495	

F statistics and significances between pairs of groups after step 5
Each F statistic has 5 and 32.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group 2 375	7.3115		
	.0001		
3 750	6.2536	6.1048	
	.0004	.0004	
4 KONTROL	20.691	27.509	15.562
	.0000	.0000	.000

At step 6, IFN_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.04658 6 3 36.0	
Approximate F	9.58596 18 88.2	.0000
RAO'S V	241.7938 18	.0000 (APPROX.)

————— Variables in the analysis after step 6 —————

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.7131311	.0012	
CD8_2	.6046959	.0025	
MO_2	.7121478	.0075	
IFN_2	.9473674	.4549	
IGA_2	.8800624	.0268	
IGM_2	.7739734	.0008	

————— Variables not in the analysis after step 6 —————

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
IGG_2	.8096346	.5998581	.6940	

F statistics and significances between pairs of groups after step 6
Each F statistic has 6 and 31.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group 2 375	6.1112		
	.0003		
3 750	5.0602	5.2476	
	.0010	.0008	
4 KONTROL	17.316	22.313	13.356
	.0000	.0000	.0000

F level or tolerance or VIN insufficient for further computation.

Summary Table

Step	Action Entered	Removed	Vars In	Wilks' Lamb	Sig.	Rao's V	Sig.	Change in V	Sig.	Label
1	CD4_2		1	.31492	.0000	78.31548	.0000	78.31548	.0000	
2	IGM_2		2	.14603	.0000	133.03635	.0000	54.72088	.0000	
3	MO_2		3	.10920	.0000	177.59662	.0000	44.56026	.0000	
4	CD8_2		4	.06797	.0000	215.77452	.0000	38.17790	.0000	
5	IGA_2		5	.05061	.0000	234.65168	.0000	18.87716	.0003	
6	IFN_2		6	.04658	.0000	241.79383	.0000	7.14215	.0675	

Classification Function Coefficients
(Fisher's Linear Discriminant Functions)

KEL =	1	2	3	4
	187.5	375	750	KONTROL
CD4_2	.1623820	-.1092221E-01	-.5522410	-.8257150
CD8_2	-.1200711E-01	.1169946	.9204994E-01	.2153181
MO_2	1.763554	1.658778	1.686898	.9706378
IFN_2	.3303365	.2614804	.3466370	.2124421
IGA_2	-.1556872	.4389256E-01	-.1034147	-.8601994E-01
IGM_2	.8322910	1.480283	1.508509	.8048924
(constant)	-31.78722	-40.79024	-33.78729	-15.57782

Canonical Discriminant Functions

Funct.	Eigenvalue	Pct. of Var	Cum. Pct.	Canon. Corr. :	After Funct.	Wilks'L.	Chi-sq.	D.F.	Sig.
1*	4.87149	72.53	72.53	.9108708	1	.2734982	44.080	10	.0000
2*	1.12169	16.70	89.23	.7271021	2	.5802782	18.504	4	.0010
3*	.72331	10.77	100.0	.6478594					

* marks the 3 canonical discriminant functions remaining in the analysis.
Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
CD4_2	.53498	-.53701	.62585
CD8_2	-.45724	.87220	.25766
MO_2	.62793	-.28685	-.41735
IFN_2	.13044	-.16759	-.36245
IGA_2	.10059	.61100	.44225
IGM_2	.32013	.80144	-.50411

Structure Matrix:

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

	FUNC1	FUNC2	FUNC3
MO_2	.64202*	-.01886	.14099
CD4_2	.62177*	-.13866	.61161
IGG_2	.26831*	.25470	.15544
IGA_2	.40418	.50927*	.40577
CD8_2	-.13034	.23326	.56555*
IGM_2	.49099	.48424	-.51673*
IFN_2	.05197	-.10400	-.24945*

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC1	FUNC2	FUNC3
--	-------	-------	-------

CD4_2	.1591093	-.1597108	.1861344
CD8_2	-.2812958E-01	.5365852E-01	.1585130E-01
MO_2	.1445767	-.6604481E-01	-.9609218E-01
IFN_2	.1621036E-01	-.2082642E-01	-.4504195E-01
IGA_2	.9974360E-02	.6058533E-01	.4385251E-01
IGM_2	.9632859E-01	.2411552	-.1516881
(constant)	-5.079397	-1.642892	1.623787

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC1	FUNC2	FUNC3
1	1.06477	-1.64524	.19786
2	1.97904	1.05872	.80537
3	.45984	.43182	-1.34213
4	-3.50365	.15470	.33890

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	187.5	6	12.512487
2	375	6	19.743976
3	750	6	12.421836
4	KONTROL	6	12.887251

Pooled Within-Groups			
Covariance Matrix	6	21.307902	
Box's M	Approximate F	Degrees of freedom	Significance
248.99	2.7071	63,	3036.7 .0000

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

On groups defined by KEL
 Analysis number 2
 Direct method: All variables passing the tolerance test are entered.

Minimum Tolerance Level..... .00100
 Canonical Discriminant Functions
 Maximum number of functions..... 3
 Minimum cumulative percent of variance... 100.00
 Maximum significance of Wilks' Lambda.... 1.0000

Prior probability for each group is .25000
 Classification Function Coefficients
 (Fisher's Linear Discriminant Functions)

KEL =	1	2	3	4
	187.5	375	750	KONTROL
CD4_2	.1495469	-.4256332E-01	-.6039181	-.8359353
CD8_2	-.1369204E-01	.1128409	.8526602E-01	.2139765
MO_2	1.768100	1.669987	1.705203	.9742582
IFN_2	.3287738	.2576280	.3403452	.2111978
IGG_2	.4158335E-01	.1025116	.1674248	.3311200E-01
IGA_2	-.1637522	.2401051E-01	-.1358866	-.9244199E-01
IGM_2	.8159870	1.440091	1.442865	.7919099
(constant)	-31.81534	-40.96114	-34.24314	-15.59565

Canonical Discriminant Functions

Funct.	Eigenvalue	Pct. of Var.	Cum. Pct.	Canon. Corr.	:After	Funct.	Wilks'L	Chi-sq.	D.F.	Sig.
						0	.0444185	104.32	21	.0000
1*	4.89428	71.74	71.74	.9112322	1	.2618150	44.894	12	.0000	
2*	1.15660	16.95	88.70	.7323293	2	.5646291	19.148	5	.0018	
3*	.77107	11.30	100.00	.6598265						

* marks the 3 canonical discriminant functions remaining in the analysis.
Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
CD4_2	.51732	-.61963	.58860
CD8_2	-.46197	.81926	.37645
MO_2	.63254	-.24151	-.44582
IFN_2	.12707	-.14614	-.35515
IGG_2	.07663	.20406	-.26305
IGA_2	.07736	.49738	.58588
IGM_2	.30796	.77929	-.32466

Structure Matrix:

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

	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
MO_2	.63997*	-.04054	.14566
CD4_2	.61784*	-.19632	.58352
IGM_2	.49313	.50882*	-.42752
IGG_2	.33008	.39749*	-.02613
CD8_2	-.13105	.18400	.57160*
IGA_2	.40364	.45877	.46255*
IFN_2	.05229	-.08216	-.25236*

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
CD4_2	.1538558	-.1842836	.1750535
CD8_2	-.2842053E-01	.5040173E-01	.2315953E-01
MO_2	.1456370	-.5560561E-01	-.1026469
IFN_2	.1579113E-01	-.1816155E-01	-.4413546E-01
IGG_2	.1208970E-01	.3219518E-01	-.4150282E-01
IGA_2	.7670993E-02	.4931881E-01	.5809485E-01
IGM_2	.9266620E-01	.2344904	-.9769222E-01
(constant)	-5.111940	-1.750254	1.377203

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
1	1.03846	-1.69168	.06422
2	1.98176	.95545	.92442
3	.49648	.61108	-1.33945
4	-3.51670	.12515	.35080

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	187.5	7	13.378068
2	375	7	21.847227

3 750 7 13.009572
 4 KONTROL 7 14.564579

Pooled Within-Groups
 Covariance Matrix 7 24.789906

Box's M Approximate F Degrees of freedom Significance
 327.24 2.4543 84, 2939.6 .0000

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

On groups defined by KEL
 Analysis number.. 1
 Number of Canonical Discriminant Functions.. 3
 List of the 6 Variables used..
 Variable Label

CD4_2
 CD8_2
 MO_2
 IFN_2
 IGA_2
 IGM_2

Classification Results -

Actual Group	No. of Cases	Predicted Group Membership			
		1	2	3	4
Group 1	10	9	0	1	0
187.5		90.0%	.0%	10.0%	.0%
Group 2	10	0	8	2	0
375		.0%	80.0%	20.0%	.0%
Group 3	10	0	0	10	0
750		.0%	.0%	100.0%	.0%
Group 4	10	0	0	1	9
KONTROL		.0%	.0%	10.0%	90.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 90.00%

Classification Processing Summary

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

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

On groups defined by KEL
 Analysis number.. 2
 Number of Canonical Discriminant Functions.. 3
 List of the 7 Variables used..
 Variable Label

CD4_2
 CD8_2
 MO_2
 IFN_2

IGG_2
IGA_2
IGM_2

Classification Results -

Actual Group	No. of Predicted Cases	Group Membership			
		1	2	3	4
Group 1 187.5	10	9 90.0%	0 .0%	1 10.0%	0 .0%
Group 2 375	10	0 .0%	8 80.0%	2 20.0%	0 .0%
Group 3 750	10	0 .0%	0 .0%	10 100.0%	0 .0%
Group 4 KONTROL	10	0 .0%	0 .0%	0 .0%	10 100.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 92.50%

Classification Processing Summary

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

LAMPIRAN 8

title 'UJI PERBEDAAN ANTAR 4 KELOMPOK PADA FTECA PARAKORTEKS'

PRO IF (GROUP=1).

MAN CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 BY kel(1,4) /pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/desig.

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

CELL NUMBER

1 2 3 4

Variable

KEL 1 2 3 4

Cell Means and Standard Deviations

Variable .. CD4_2

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf.Interval
KEL	187.5	15.300	13.475	10	5.661	24.939
KEL	375	6.100	2.424	10	4.366	7.834
KEL	750	2.900	3.985	10	.050	5.750
KEL	KONTROL	1.000	1.054	10	.246	1.754
For entire sample		6.325	8.839	40	3.498	9.152

Variable .. CD8_2

FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL	187.5	153.500	52.960	10	115.615	191.385
KEL	375	102.200	54.997	10	62.858	141.542
KEL	750	64.900	25.796	10	46.447	83.353
KEL	KONTROL	46.400	24.263	10	29.043	63.757



For entire sample	91.750	57.901	40	73.232	110.268	

Variable .. MO_2						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL	187.5	37.900	10.005	10	30.743	45.057
KEL	375	21.900	2.923	10	19.809	23.991
KEL	750	17.100	4.818	10	13.654	20.546
KEL	KONTROL	16.100	4.581	10	12.823	19.377
For entire sample	23.250	10.657	40	19.842	26.658	

Variable .. IFN_2						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL	187.5	7.800	2.530	10	5.990	9.610
KEL	375	7.000	6.912	10	2.055	11.945
KEL	750	23.400	8.343	10	17.432	29.368
KEL	KONTROL	8.700	12.517	10	-.254	17.654
For entire sample	11.725	10.568	40	8.345	15.105	

Variable .. IGG_2						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL	187.5	13.400	1.955	10	12.001	14.799
KEL	375	40.500	9.301	10	33.847	47.153
KEL	750	6.100	2.331	10	4.433	7.767
KEL	KONTROL	3.200	4.662	10	-.135	6.535
For entire sample	15.800	15.807	40	10.745	20.855	

Variable .. IGA_2						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL	187.5	12.800	2.440	10	11.054	14.546
KEL	375	32.700	5.250	10	28.944	36.456
KEL	750	8.400	4.142	10	5.437	11.363
KEL	KONTROL	2.200	3.645	10	-.408	4.808
For entire sample	14.025	12.188	40	10.127	17.923	

Variable .. IGM_2						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
KEL	187.5	12.500	3.100	10	10.282	14.718
KEL	375	23.500	3.136	10	21.257	25.743
KEL	750	7.000	3.018	10	4.841	9.159
KEL	KONTROL	2.400	3.658	10	-.216	5.016
For entire sample	11.350	8.559	40	8.613	14.087	

*****ANALYSIS OF VARIANCE – DESIGN 1*****

EFFECT .. KEL

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = 1 1/2, N = 14)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	2.17367	12.02524	21.00	96.00	.000
Hotellings	30.75441	41.98221	21.00	86.00	.000
Wilks	.00405	23.99746	21.00	86.69	.000
Roys	.96207				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	25.36511	82.47634	82.47634	.98085
2	4.76296	15.48707	97.96340	.90911
3	.62634	2.03660	100.00000	.62058

Dimension Reduction Analysis

Roots	Wilks L.	F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
1 TO 3	.00405	23.99746	21.00	86.69	.000
2 TO 3	.10669	10.65088	12.00	62.00	.000
3 TO 3	.61488	4.00860	5.00	32.00	.006

Univariate F-tests with (3,36) D. F.

Variable	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig.of F
CD4_2	1206.87500	1839.90000	402.29167	51.10833	7.87135	.000
CD8_2	66998.1000	63751.4000	22332.7000	1770.87222	12.61113	.000
MO_2	3053.90000	1375.60000	1017.96667	38.21111	26.64059	.000
IFN_2	1831.87500	2524.10000	610.62500	70.11389	8.70904	.000
IGG_2	8687.00000	1057.40000	2895.66667	29.37222	98.58521	.000
IGA_2	5217.27500	575.70000	1739.09167	15.99167	108.74987	.000
IGM_2	2479.70000	377.40000	826.56667	10.48333	78.84579	.000

Averaged F-test with (21,252) D. F.

VARIABLES	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	Error MS	F	Sig.of F
1 to 7	89474.72500	71501.50000	260.70119	283.73611	15.01642	.000

PRO IF (GROUP=1).

dsc group KEL(1,4)/VAR CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 /met
 rao/PIN=0.5/POUT=0.5/ana all/stat all.

*****DISCRIMINANT ANALYSIS*****

On groups defined by KEL

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

Number of Cases by Group

KEL	Number of Cases		Label
	Unweighted	Weighted	
1	10	10.0	187.5
2	10	10.0	375
3	10	10.0	750
4	10	10.0	KONTROL
Total	40	40.0	

Group Means

KEL	CD4_2	CD8_2	MO_2	IFN_2	IGG_2	IGA_2	IGM_2
1	15.30000	153.50000	37.90000	7.80000	13.40000	12.80000	12.50000
2	6.10000	102.20000	21.90000	7.00000	40.50000	32.70000	23.50000
3	2.90000	64.90000	17.10000	23.40000	6.10000	8.40000	7.00000
4	1.00000	46.40000	16.10000	8.70000	3.20000	2.20000	2.40000
Total	6.32500	91.75000	23.25000	11.72500	15.80000	14.02500	11.35000

Group Standard Deviations

KEL	CD4_2	CD8_2	MO_2	IFN_2	IGG_2	IGA_2	IGM_2
1	3.47467	52.95963	10.00500	2.52982	1.95505	2.44040	3.10018
2	2.42441	54.99657	2.92309	6.91215	9.30054	5.25040	3.13581
3	3.98469	25.79599	4.81779	8.34266	2.33095	4.14193	3.01846
4	1.05409	24.26337	4.58136	12.51710	4.66190	3.64539	3.65756
Total	8.83869	57.90122	10.65725	10.56843	15.80685	12.18761	8.55915

Wilks' Lambda (U-statistic) and univariate F-ratio
 with 3 and 36 degrees of freedom

Variable	Wilks' Lambda	F	Significance
CD4_2	.60388	7.871	.0004
CD8_2	.48758	12.61	.0000
MO_2	.31055	26.64	.0000
IFN_2	.57946	8.709	.0002
IGG_2	.10851	98.59	.0000
IGA_2	.09938	108.7	.0000
IGM_2	.13209	78.85	.0000

*****DISCRIMINANT ANALYSIS*****

On groups defined by KEL
 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..... 3
 Minimum cumulative percent of variance... 100.00
 Maximum significance of Wilks' Lambda... 1.0000
 Prior probability for each group is .25000

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD4_2	1.0000000	1.0000000	.0004	23.61406
CD8_2	1.0000000	1.0000000	.0000	37.83339
MO_2	1.0000000	1.0000000	.0000	79.92178
IFN_2	1.0000000	1.0000000	.0002	26.12713
IGG_2	1.0000000	1.0000000	.0000	295.7556
IGA_2	1.0000000	1.0000000	.0000	326.2496
IGM_2	1.0000000	1.0000000	.0000	236.5374

At step 1, IGA_2 was included in the analysis.

	Wilks' Lambda	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
	.09938	1 3	36.0
Equivalent F	108.750	3	36.0
RAO'S V	326.2496	3	.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
IGA_2	1.0000000	.0000	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD4_2	.9820990	.9820990	.0004	362.6298

CD8_2	.8384747	.8384747	.0000	480.1815
MO_2	.9365845	.9365845	.0000	450.2027
IFN_2	.9933367	.9933367	.0006	349.1778
IGG_2	.9403852	.9403852	.0007	501.4392
IGM_2	.9569617	.9569617	.0018	468.9553

F statistics and significances between pairs of groups after step 1
Each F statistic has 1 and 36.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group			
2 375	123.82		
	.0000		
3 750	6.0532	184.62	
	.0188	.0000	
4 KONTROL	35.131	290.85	12.019
	.0000	.0000	.0014

At step 2, IGG_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom			Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.06171	2	3	36.0
Equivalent F	35.2987	6	70.0	.0000
RAO'S V	501.4392	6		.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
IGG_2	.9403852	.0007	
IGA_2	.9403852	.0002	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance F to enter	Rao's V	
CD4_2	.9797872	.9272071	.0005	542.7454
CD8_2	.8343559	.7856280	.0000	637.7362
MO_2	.9324990	.8769085	.0000	616.2028
IFN_2	.9620020	.9107208	.0014	525.7788
IGM_2	.9569572	.9020388	.0055	644.8008

F statistics and significances between pairs of groups after step 2
Each F statistic has 2 and 35.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group			
2 375	97.224		
	.0000		
3 750	5.9478	150.89	
	.0060	.0000	
4 KONTROL	21.019	206.53	5.9058
	.0000	.0000	

At step 3, IGM_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
--	--------------------	------------------------

Wilks' Lambda	.04277	3	3	36.0	
Approximate F	24.4198		9	82.9	.0000
RAO'S V	644.8008		9		.0000 (APPROX.)

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

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
IGG_2	.9403807	.0023	
IGA_2	.9020388	.0253	
IGM_2	.9569572	.0055	

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

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
CD4_2	.9664772	.8843914	.0044	673.9176
CD8_2	.8203207	.7711549	.0000	820.4113
MO_2	.9316398	.8459494	.0000	765.0794
IFN_2	.9403048	.9020103	.0014	678.9450

F statistics and significances between pairs of groups after step 3.
Each F statistic has 3 and 34.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
Group	187.5	375	750
2 375	72.229		
	.0000		
3 750	7.4198	122.05	
	.0006	.0000	
4 KONTROL	24.495	173.98	5.8129
	.0000	.0000	.0026

At step 4, CD8_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.02014 4 3 36.0	
Approximate F	24.6382 12 87.6	.0000
RAO'S V	820.4113 12	.0000 (APPROX.)

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

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD8_2	.8203207	.0000	
IGG_2	.9357200	.0031	
IGA_2	.7711549	.0057	
IGM_2	.9408597	.0202	

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

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
CD4_2	.9664207	.7576467	.0638	850.5182
MO_2	.9298114	.7351134	.0001	929.8745
IFN_2	.9379865	.7710096	.0018	851.5447

F statistics and significances between pairs of groups after step 4
 Each F statistic has 4 and 33.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group			
2 375	53.512		
	.0000		
3 750	15.245	105.69	
	.0000	.0000	
4 KONTROL	38.429	156.95	6.1946
	.0000	.0000	.0008

At step 5, MO_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.01006 5 3 36.0	
Approximate F	25.3840 15 88.7	.0000
RAO'S V	929.8745 15	.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD8_2	.8187107	.0124	
MO_2	.9298114	.0001	
IGG_2	.9320285	.0040	
IGA_2	.7351134	.0036	
IGM_2	.9403004	.0394	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD4_2	.7391543	.6855282	.0015	1075.547
IFN_2	.9355552	.7346744	.0031	961.3703

F statistics and significances between pairs of groups after step 5
 Each F statistic has 5 and 32.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
	187.5	375	750
Group			
2 375	43.816		
	.0000		
3 750	23.468	85.576	
	.0000	.0000	
4 KONTROL	45.173	127.53	5.0629
	.0000	.0000	.0016

At step 6, CD4_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.00615 6 3 36.0	
Approximate F	24.7298 18 88.2	.0000
RAO'S V	1075.547 18	.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 6 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD4_2	.7391543	.0015	
CD8_2	.8185056	.0688	
MO_2	.7111541	.0000	
IGG_2	.9316579	.0066	
IGA_2	.6855282	.0016	
IGM_2	.9273088	.0890	

----- Variables not in the analysis after step 6 -----

Variable	Tolerance	Minimum Signif. of Tolerance F to enter	Rao's V
IFN_2	.9321687	.6854844	.0052 1107.159

F statistics and significances between pairs of groups after step 6
Each F statistic has 6 and 31.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
Group	187.5	375	750
2 375	37.481		
	.0000		
3 750	30.898	73.105	
	.0000	.0000	
4 KONTROL	52.999	109.78	4.4576
	.0000	.0000	.0023

At step 7, IFN_2 was included in the analysis

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.00405 7 3 36.0	
Approximate F	23.9975 21 86.7	.0000
RAO'S V	1107.159 21	.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 7 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD4_2	.7364787	.0025	
CD8_2	.8165843	.0872	
MO_2	.7109847	.0000	
IFN_2	.9321687	.0052	
IGG_2	.8989551	.0136	
IGA_2	.6854844	.0028	
IGM_2	.9106046	.0766	

F statistics and significances between pairs of groups after step 7
Each F statistic has 7 and 30.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3
Group	187.5	375	750
2 375	32.162		
	.0000		
3 750	26.948	60.653	
	.0000	.0000	
4 KONTROL	44.186	93.337	6.3250
	.0000	.0000	.0001

F level or tolerance or VIN insufficient for further computation.

Summary Table

Step	Action	Entered	Removed	Vars In	Wilks' Lamb	Sig.	Rao's V	Sig.	Change in V	Sig.	Label
1	IGA_2			1	.09938	.0000	326.24961	.0000	326.24961	.0000	
2	IGG_2			2	.06171	.0000	501.43922	.0000	175.18962	.0000	
3	IGM_2			3	.04277	.0000	644.80080	.0000	143.36157	.0000	
4	CD8_2			4	.02014	.0000	20.41134	.0000	175.61055	.0000	
5	MO_2			5	.01006	.0000	29.87450	.0000	109.46316	.0000	
6	CD4_2			6	.00615	.0000	1075.54679	.0000	145.67229	.0000	
7	IFN_2			7	.00405	.0000	1107.15867	.0000	31.61188	.0000	

Classification Function Coefficients
(Fisher's Linear Discriminant Functions)

KEL =	1	2	3	4
	187.5	375	750	KONTROL
CD4_2	1.080981	.8152088	.4315617	.2940698
CD8_2	.1378422	.1624099	.6495379E-01	.3421298E-01
MO_2	1.764052	1.330538	.7728350	.6219500
IFN_2	.2236062	.3895342	.4076698	.1477875
IGG_2	.2636108	1.056913	.1729140	.8642856E-01
IGA_2	2.085391	2.813762	1.090466	.5454937
IGM_2	1.156348	2.069999	.7503711	.2731244
(constant)	-76.87591	-119.8346	-23.23093	-9.042721

Canonical Discriminant Functions

Funct.	Eigenvalue	Pct. of Var.	Cum. Pct	Canon.:After	Corr. :Funct.	Wilks'Lamb.	Chi-sq.	D.F.	Sig.
1*	25.36511	82.48	82.48	.9808529	1	.0040468	184.58	21	.0000
2*	4.76296	15.49	97.96	.9091083	2	.1066946	74.966	12	.0000
3*	.62634	2.04	100.00	.6205833		.6148764	16.292	5	.0061

* marks the 3 canonical discriminant functions remaining in the analysis.

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
CD8_2	.44938	.21724	.10138
MO_2	.44101	.89930	-.00078
IFN_2	.09058	-.20909	.91610
IGG_2	.39761	-.41809	-.28877
IGA_2	.73137	.12582	.18013
IGM_2	.44174	-.14889	.19849

Structure Matrix:

Pooled-within-groups correlations between discriminating variables and canonical discriminant functions

(Variables ordered by size of correlation within function)

	FUNC1	FUNC2	FUNC3
IGA_2	.57274*	-.39456	.02216
IGG_2	.53576*	-.41566	-.42219
IGM_2	.50363*	-.16797	.06297
MO_2	.13706	.60492*	-.03262
CD8_2	.13652	.34726*	.07825
CD4_2	.08539	.31388*	.05315

IFN_2 -.07712 -.08906 .92604*

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
CD4_2	.5048031E-01	.9482872E-01	.1391956E-01
CD8_2	.1067873E-01	.5162424E-02	.2409096E-02
MO_2	.7134323E-01	.1454817	-.1260879E-03
IFN_2	.1081772E-01	-.2497075E-01	.1094063
IGG_2	.7336440E-01	-.7714440E-01	-.5328176E-01
IGA_2	.1828890	.3146295E-01	.4504324E-01
IGM_2	.1364307	-.4598622E-01	.6130359E-01
(constant)	-8.357293	-2.863555	-2.074609

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3
1	1.87197	3.49291	-.01438
2	6.83799	-1.92243	-.22477
3	-3.10594	-.87828	1.16253
4	-5.60402	-.69219	-.92338

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	187.5	7	19.825625
2	375	7	21.875245
3	750	7	20.497250
4	KONTROL	7	14.564579

Pooled Within-Groups Covariance Matrix		7	27.059540	
Box's M	Approximate	F	Degrees of freedom	Significance
283.28	2.1246	84,	2939.6	.0000

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

On groups defined by KEL
 Analysis number.. 1
 Number of Canonical Discriminant Functions.. 3
 List of the 7 Variables used..

Variable Label

CD4_2
 CD8_2
 MO_2
 IFN_2
 IGG_2
 IGA_2
 IGM_2

Classification Results -
 No. of Predicted Group Membership

Actual Group	Cases	1	2	3	4
Group 1 187.5	10	10 100.0%	0 .0%	0 .0%	0 .0%
Group 2	10	0 .0%	10 100.0%	0 .0%	0 .0%
Group 3 750	10	0 .0%	0 .0%	9 90%	1 .10%
Group 4 KONTROL	10	0 .0%	0 .0%	2 20.0%	8 80.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 92.50%

Classification Processing Summary

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

LAMPIRAN 9

UJI PERBEDAAN ANTAR 4 KELOMPOK EMCA DAN FTECA DAERAH PARAKORTEKS

title 'UJI PERBEDAAN ANTAR 4 KELOMPOK PADA FMECA+FMECA PARAKORTEKS'
 PRO IF (KELOMPOK<7). MAN CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 BY
 KELOMPOK(1,6)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/degis.

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

1 design will be processed.

```

-----
                CELL NUMBER
                1  2  3  4  5  6
Variable
KELOMPOK      1  2  3  4  5  6
    
```

Cell Means and Standard Deviations

Variable ..	CD4_2	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf. Interval
FACTOR CODE						
KEL	FT187.5	15.300	13.475	10	5.661	24.939
KEL	FT375	6.100	2.424	10	4.366	7.834
KEL	FT750	2.900	3.985	10	.050	5.750
KEL	FM187.5	11.100	2.807	10	9.092	13.108
KEL	FM375	13.000	5.696	10	8.925	17.075
KEL	FM750	5.700	1.947	10	4.308	7.092
For entire sample		9.017	7.583	60	7.058	10.976

Variable .. CD8_2							
FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf. Interval	
KEL	FT187.5	153.500	52.960	10	115.615	191.385	
KEL	FT375	102.200	54.997	10	62.858	141.542	
KEL	FT750	64.900	25.796	10	46.447	83.353	
KEL	FM187.5	28.600	13.492	10	18.948	38.252	
KEL	FM375	42.500	14.554	10	32.088	52.912	
KEL	FM750	23.600	8.618	10	17.435	29.765	
For entire sample		69.217	56.630	60	54.588	83.846	

Variable .. MO_2							
FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf. Interval	
KEL	FT187.5	37.900	10.005	10	30.743	45.057	
KEL	FT375	21.900	2.923	10	19.809	23.991	
KEL	FT750	17.100	4.818	10	13.654	20.546	
KEL	FM187.5	28.900	5.043	10	25.292	32.508	
KEL	FM375	31.600	4.624	10	28.292	34.908	
KEL	FM750	26.100	2.767	10	24.121	28.079	
For entire sample		27.250	8.594	60	25.030	29.470	

Variable .. IFN_2							
FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf. Interval	
KEL	FT187.5	7.800	2.530	10	5.990	9.610	
KEL	FT375	7.000	6.912	10	2.055	11.945	
KEL	FT750	23.400	8.343	10	17.432	29.368	
KEL	FM187.5	12.400	4.222	10	9.380	15.420	
KEL	FM375	9.300	4.739	10	5.910	12.690	
KEL	FM750	13.500	7.878	10	7.865	19.135	
For entire sample		12.233	8.083	60	10.145	14.321	

Variable .. IGG_2							
FACTOR	CODE	Mean	Std.Dev.	N	95 percent	Conf. Interval	
KEL	FT187.5	13.400	1.955	10	12.001	14.799	
KEL	FT375	40.500	9.301	10	33.847	47.153	
KEL	FT750	6.100	2.331	10	4.433	7.767	
KEL	FM187.5	8.200	3.120	10	5.968	10.432	
KEL	FM375	16.700	10.975	10	8.849	24.551	
KEL	FM750	13.100	2.961	10	10.982	15.218	
For entire sample		16.333	12.923	60	12.995	19.672	

Variable .. IGA_2							
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval	
KEL	FT187.5	12.800	2.440	10	11.054	14.546	
KEL	FT375	32.700	5.250	10	28.944	36.456	
KEL	FT750	8.400	4.142	10	5.437	11.363	
KEL	FM187.5	11.000	2.667	10	9.092	12.908	
KEL	FM375	31.100	19.530	10	17.129	45.071	
KEL	FM750	12.900	2.234	10	11.302	14.498	
For entire sample		18.150	12.898	60	14.818	21.482	

Variable .. IGM_2							
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent	Conf. Interval	
KEL	FT187.5	12.500	3.100	10	10.282	14.718	
KEL	FT375	23.500	3.136	10	21.257	25.743	
KEL	FT750	7.000	3.018	10	4.841	9.159	
KEL	FM187.5	7.200	1.687	10	5.994	8.406	
KEL	FM375	12.000	5.011	10	8.415	15.585	
KEL	FM750	12.200	1.687	10	10.994	13.406	
For entire sample		12.400	6.285	60	10.776	14.024	

**** ANALYSIS OF VARIANCE – DESIGN 1 ****

EFFECT .. KELOMPOK

Multivariate Tests of Significance (S = 5, M = 1/2, N = 23)

Test Name	Value	Approx.F	Hypoth.DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	2.60192	8.06003	35.00	260.00	.000
Hotellings	12.94259	17.15817	35.00	232.00	.000
Wilks	.00713	13.07083	35.00	204.35	.000
Roys	.88375				

Eigenvalues and Canonical Correlations

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	7.60213	58.73733	58.73733	.94008
2	3.36422	25.99343	84.73077	.87799
3	1.52447	11.77867	96.50944	.77709
4	.37676	2.91097	99.42042	.52312
5	.07501	.57958	100.00000	.26416

Dimension Reduction Analysis

Roots	Wilks L.	F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
1 TO 5	.00713	13.07083	35.00	204.35	.000
2 TO 5	.06133	8.79378	24.00	172.15	.000
3 TO 5	.26765	5.64787	15.00	138.43	.000
4 TO 5	.67566	2.76120	8.00	102.00	.008
5 TO 5	.93022	1.30023	3.00	52.00	.284

Univariate F-tests with (5,54) D. F.

Var.	Hypoth.SS	Error SS	Hypoth.MS	Error MS	F	Sig. of F
CD4_2	1166.08333	2226.90000	233.21667	41.23889	5.65526	.000
CD8_2	126545.883	62666.3000	25309.1767	1160.48704	21.80910	.000
MO_2	2680.35000	1676.90000	536.07000	31.05370	17.26268	.000
IFN_2	1819.73333	2035.00000	363.94667	37.68519	9.65755	.000
IGG_2	7740.93333	2112.40000	1548.18667	39.11852	39.57682	.000
IGA_2	5817.75000	3997.90000	1163.55000	74.03519	15.71618	.000
IGM_2	1796.20000	534.20000	359.24000	9.89259	36.31404	.000

Averaged F-test with (35,378) D. F.

VAR.	Hypoth.SS	ErrorSS	Hypoth.MS	ErrorMS	F	Sig. of F
1 to 7	147566.93333	75249.60000	4216.19810	199.07302	21.17915	.000

PRO IF (KELOMPOK<7).

dsc group KELOMPOK(1,6)/VAR CD4_2 CD8_2 MO_2 IFN_2 IGG_2 IGA_2 IGM_2 /met
 rao/PIN=0.5/POUT=0.5/ana all/stat all.

*****DISCRIMINANT ANALYSIS*****

On groups defined by KELOMPOK

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

Number of Cases by Group

KELOMPOK	Unweighted	Weighted	Label
1	10	10.0	FT187.5
2	10	10.0	FT375
3	10	10.0	FT750

4	10	10.0 FM187.5
5	10	10.0 FM375
6	10	10.0 FM750
Total	60	60.0

Group Means

KEL.	CD4_2	CD8_2	MO_2	IFN_2	IGG_2	IGA_2	IGM_2
1	15.30000	153.50000	37.90000	7.80000	13.40000	12.80000	12.50000
2	6.10000	102.20000	21.90000	7.00000	40.50000	32.70000	23.50000
3	2.90000	64.90000	17.10000	23.40000	6.10000	8.40000	7.00000
4	11.10000	28.60000	28.90000	12.40000	8.20000	11.00000	7.20000
5	13.00000	42.50000	31.60000	9.30000	16.70000	31.10000	12.00000
6	5.70000	23.60000	26.10000	13.50000	13.10000	12.90000	12.20000
Total	9.01667	69.21667	27.25000	12.23333	16.33333	18.15000	12.40000

Group Standard Deviations

KEL.	CD4_2	CD8_2	MO_2	IFN_2	IGG_2	IGA_2	IGM_2
1	13.47467	52.95963	10.00500	2.52982	1.95505	2.44040	3.10018
2	2.42441	54.99657	2.92309	6.91215	9.30054	5.25040	3.13581
3	3.98469	25.79599	4.81779	8.34266	2.33095	4.14193	3.01846
4	2.80674	13.49238	5.04315	4.22164	3.11983	2.66667	1.68655
5	5.69600	14.55450	4.62361	4.73873	10.97522	19.53032	5.01110
6	1.94651	8.61781	2.76687	7.87753	2.96086	2.23358	1.68655
Total	7.58342	56.63026	8.59370	8.08297	12.92307	12.89833	6.28477

Wilks' Lambda (U-statistic) and univariate F-ratio with 5 and 54 degrees of freedom

Variable	Wilks' Lambda	F	Significance
CD4_2	.65633	5.655	.0003
CD8_2	.33120	21.81	.0000
MO_2	.38485	17.26	.0000
IFN_2	.52792	9.658	.0000
IGG_2	.21438	39.58	.0000
IGA_2	.40730	15.72	.0000
IGM_2	.22923	36.31	.0000

*****DISCRIMINANT ANALYSIS*****

On groups defined by KELOMPOK

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..... 5
- Minimum cumulative percent of variance... 100.00
- Maximum significance of Wilks' Lambda.... 1.0000

Prior probability for each group is .16667

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
----------	-------------------	----------------------	------------	---------

CD4_2	1.0000000	1.0000000	.0003	28.27630
CD8_2	1.0000000	1.0000000	.0000	109.0455
MO_2	1.0000000	1.0000000	.0000	86.31338
IFN_2	1.0000000	1.0000000	.0000	48.28776
IGG_2	1.0000000	1.0000000	.0000	197.8841
IGA_2	1.0000000	1.0000000	.0000	78.58088
IGM_2	1.0000000	1.0000000	.0000	181.5702

At step 1, IGG_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.21438 1 5 54.0	
Equivalent F	39.5768 5 54.0	.0000
RAO'S V	197.8841 5	.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
IGG_2	1.0000000	.0000	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD4_2	.9990599	.9990599	.0004	226.8482
CD8_2	.9914608	.9914608	.0000	318.8652
MO_2	.9929258	.9929258	.0000	283.0740
IFN_2	.9960079	.9960079	.0000	254.8997
IGA_2	.8781783	.8781783	.0001	234.0255
IGM_2	.9485727	.9485727	.0002	311.0649

F statistics and significances between pairs of groups after step 1
Each F statistic has 1 and 54.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3	4	5
	FT187.5	FT375	FT750	FM187.5	FM375
Group 2 FT375	93.870				
	.0000				
3 FT750	6.8114	151.25			
	.0117	.0000			
4 FM187.5	3.4562	133.35	.56367		
	.0685	.0000	.4560		
5 FM375	1.3919	72.400	14.361	9.2348	
	.2433	.0000	.0004	.0037	
6 FM750	11504E-01	95.960	6.2630	3.0689	1.6565
	.9150	.0000	.0154	.0855	.2036

At step 2, CD8_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.07402 2 5 54.0	
Equivalent F	28.3601 10 106.0	.0000
RAO'S V	318.8652 10	.0000 (APPROX.)

————— Variables in the analysis after step 2 —————

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CD8_2	.9914608	.0000	
IGG_2	.9914608	.0000	

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

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
CD4_2	.9923313	.9847833	.0011	346.1237
MO_2	.9665689	.9651428	.0000	397.0523
IFN_2	.9945561	.9870805	.0001	379.0423
IGA_2	.8766238	.8736056	.0003	354.7713
IGM_2	.9387614	.9387614	.0004	447.3016

F statistics and significances between pairs of groups after step 2
Each F statistic has 2 and 53.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3	4	5
	FT187.5	FT375	FT750	FM187.5	FM375
Group					
2 FT375	49.090 .0000				
3 FT750	21.501 .0000	80.587 .0000			
4 FM187.5	36.373 .0000	82.659 .0000	2.9254 .0624		
5 FM375	26.178 .0000	46.487 .0000	7.6688 .0012	5.2366 .0084	
6 FM750	36.075 .0000	65.295 .0000	6.1169 .0041	1.5197 .2282	1.7278 .187

At step 3, IGM_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.04835 3 5 54.0	
Approximate F	19.1560 15 144.0	.0000
RAO'S V	447.3016 15	.0000 (APPROX.)

————— Variables in the analysis after step 3 —————

Variable	Tolerance	Signif. Of F to remove	Rao's V
CD8_2	.9812058	.0000	
IGG_2	.9442482	.0001	
IGM_2	.9387614	.0004	

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

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
CD4_2	.9825194	.9294792	.0011	478.6315
MO_2	.9642381	.9364976	.0000	525.9620

IFN_2	.9920270	.9363741	.0003	501.3541
IGA_2	.8614047	.8192542	.0003	492.3550

F statistics and significances between pairs of groups after step 3
Each F statistic has 3 and 52.0 degrees of freedom.

Group	1 FT187.5	2 FT375	3 FT750	4 FM187.5	5 FM375
Group					
2 FT375	41.996 .0000				
3 FT750	19.320 .0000	82.272 .0000			
4 FM187.5	29.763 .0000	85.292 .0000	1.9363 .1352		
5 FM375	17.734 .0000	45.821 .0000	7.2989 .0004	6.1870 .0011	
6 FM750	23.964 .0000	56.781 .0000	6.8423 .0006	4.3671 .0081	1.1606 .3337

At step 4, MO_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.02036 4 5 54.0	
Approximate F	19.0126 20 170.1	.0000
RAO'S V	525.9620 20	.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD8_2	.9538109	.0000	
MO_2	.9642381	.0000	
IGG_2	.9383842	.0001	
IGM_2	.9364976	.0005	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
CD4_2	.9125070	.8955284	.0012	591.5587
IFN_2	.9827861	.9318292	.0060	589.1362
IGA_2	.8282994	.8017339	.0008	570.5266

F statistics and significances between pairs of groups after step 4
Each F statistic has 4 and 51.0 degrees of freedom.

Group	1 FT187.5	2 FT375	3 FT750	4 FM187.5	5 FM375
Group					
2 FT375	38.219 .0000				
3 FT750	27.558 .0000	61.413 .0000			
4 FM187.5	23.072 .0000	65.366 .0000	8.0152 .0000		
5 FM375	13.393 .0000	38.187 .0000	14.754 .0000	4.7973 .0023	
6 FM750	20.295	42.920	9.1142	3.5117	1.9423

.0000 .0000 .0000 .0132 .1176

At step 5, CD4_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom			Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.01379	5	5	54.0
Approximate F	16.2385	25	187.2	.0000
RAO'S V	591.5587	25		.0000 (APPROX.)

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

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.9125070	.0012	
CD8_2	.9352422	.0000	
MO_2	.8955284	.0000	
IGG_2	.9383550	.0001	
IGM_2	.9238143	.0004	

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

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
IFN_2	.9825975	.8883709	.0223	653.8620
IGA_2	.8194036	.8001179	.0011	638.4367

F statistics and significances between pairs of groups after step 5
Each F statistic has 5 and 50.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3	4	5
	FT187.5	FT375	FT750	FM187.5	FM375
Group					
2 FT375	35.720				
	.0000				
3 FT750	27.374	48.167			
	.0000	.0000			
4 FM187.5	18.253	55.269	10.300		
	.0000	.0000	.0000		
5 FM375	10.542	34.804	16.438	3.8036	
	.0000	.0000	.0000	.0054	
6 FM750	18.290	34.396	7.8871	4.0628	3.3366
	.0000	.0000	.0000	.0036	.0112

At step 6, IFN_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom			Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.01063	6	5	54.0
Approximate F	13.9523	30	198.0	.0000
RAO'S V	653.8620	30		.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 6 -----

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.9123319	.0050	
CD8_2	.9349332	.0000	
MO_2	.8883709	.0000	
IFN_2	.9825975	.0223	
IGG_2	.9318112	.0002	
IGM_2	.9211829	.0011	

Variables not in the analysis after step 6

Variable	Minimum Tolerance	Signif. of Tolerance	F to enter	Rao's V
IGA_2	.8167259	.7922763	.0014	698.8997

F statistics and significances between pairs of groups after step 6
Each F statistic has 6 and 49.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3	4	5
	FT187.5	FT375	FT750	FM187.5	FM375
Group					
2 FT375	29.172				
	.0000				
3 FT750	28.901	46.026			
	.0000	.0000			
4 FM187.5	15.585	45.861	11.423		
	.0000	.0000	.0000		
5 FM375	8.7044	28.536	18.485	3.3708	
	.0000	.0000	.0000	.0073	
6 FM750	16.002	29.213	8.7725	3.3614	3.2472
	.0000	.0000	.0000	.0075	.0091

At step 7, IGA_2 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom			Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	.00713	7	5	54.0
Approximate F	13.0708	35	204.3	.0000
RAO'S V	698.8997	35		.0000 (APPROX.)

Variables in the analysis after step 7

Variable	Signif. of Tolerance	F to remove	Rao's V
CD4_2	.9026509	.0059	
CD8_2	.9251673	.0000	
MO_2	.8451597	.0000	
IFN_2	.9793865	.0254	
IGG_2	.7922763	.0117	
IGA_2	.8167259	.0014	
IGM_2	.8981295	.0009	

F statistics and significances between pairs of groups after step 7
Each F statistic has 7 and 48.0 degrees of freedom.

Group	1	2	3	4	5
	FT187.5	FT375	FT750	FM187.5	FM375
Group					
2 FT375	26.874				
	.0000				
3 FT750	24.515	39.736			
	.0000	.0000			
4 FM187.5	13.087	40.984	9.8712		
	.0000	.0000	.0000		
5 FM375	10.043	23.973	16.857	5.6695	
	.0000	.0000	.0000	.0001	
6 FM750	13.508	26.153	7.4187	2.9120	4.6468
	.0000	.0000	.0000	.0127	.0005

F level or tolerance or VIN insufficient for further computation.

Summary Table												
Step	Action	Entered	Removed	Vars	Wilks'	Lambda	Sig.	Rao's V	Sig.	Change in V	Sig.	Label
1	IGG_2			1	.21438	.0000	197.88411	.0000	197.88411	.0000		
2	CD8_2			2	.07402	.0000	318.86521	.0000	120.98110	.0000		
3	IGM_2			3	.04835	.0000	447.30159	.0000	128.43638	.0000		
4	MO_2			4	.01379	.0000	591.55866	.0000	65.59666	.0000		
5	CD4_2			5	.01379	.0000	591.55866	.0000	65.59666	.0000		
6	IFN_2			6	.01063	.0000	653.86197	.0000	62.30331	.0000		
7	IGA_2			7	.00713	.0000	698.89972	.0000	45.03775	.0000		

Classification Function Coefficients
(Fisher's Linear Discriminant Functions)

KEL.=	1	2	3	4	5	6
	FT187.5	FT375	FT750	FM187.5	FM375	FM750
CD4_2	.5376390	.9882558E-01	.1271678	.4732747	.4705620	.2736798
CD8_2	.1066370	.1105032	.4875956E-01	.3885272E-02	.1960424E-01	.6884820E-02
MO_2	1.274242	.6100809	.4565440	1.056291	1.069447	.8838506
IFN_2	.1026263	.1155895	.5920215	.2578476	.1805454	.3007580
IGG_2	.3373599	.7557243	.4519769E-01	.1941582	.2396238	.2291944
IGA_2	5184696E-02	.2541320	.8554957E-01	.1376757E-03	.2720834	.4843643E-01
IGM_2	1.127414	2.180119	.7689999	.5410950	1.057856	1.094874
(constant)	-47.97604	-59.89971	-17.57716	-23.96968	-35.58269	-24.70972

Canonical Discriminant Functions

Funct.	Eigenvalue	Pct of Var.	Cum. Pct	Canon. Corr	After Funct.	Wilks'L	Chi-sq	D.F.	Sig
1*	7.60213	58.74	58.74	.9400796	1	.0071293	259.54	35	.0000
2*	3.36422	25.99	84.73	.8779887	2	.2676456	69.200	15	.0000
3*	1.52447	11.78	96.51	.7770949	3	.6756619	20.583	8	.0083
4*	.37676	2.91	99.42	.5231200	4	.9302211	3.7975	3	.2842
5*	.07501	.58	100.00	.2641569					

* marks the 5 canonical discriminant functions remaining in the analysis.
Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC1	FUNC2	FUNC3	FUNC4	FUNC5
CD4_2	-.14629	.59173	-.13646	.12524	-.33594
CD8_2	.44557	.09461	.85289	.34678	-.03380
MO_2	-.08909	.87609	-.19614	-.22695	.22652
IFN_2	-.24924	-.41461	.21240	.23178	.22134
IGG_2	.51392	.03511	-.07421	-.42456	-.73476
IGA_2	.22513	-.13736	-.37899	.96306	.23090
IGM_2	.60577	-.14434	-.01446	-.12096	.73474

Structure Matrix:

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

	FUNC1	FUNC2	FUNC3	FUNC4	FUNC5
--	-------	-------	-------	-------	-------

IGG_2	.67596*	-.13605	-.26285	-.11033	-.49979
IGM_2	.65543*	-.06058	-.14278	-.29345	.52607
MO_2	-.00635	.68563*	-.04441	-.01108	.42537
CD4_2	.00175	.38339*	-.04722	.21045	-.34675
IFN_2	-.23011	-.34413*	.22585	.18678	.17781
CD8_2	.27491	.30023	.85141*	.31047	-.05128
IGA_2	.33499	.01885	-.49907	.76613*	-.03325

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1	FUNC 2	FUNC 3	FUNC 4	FUNC 5
CD4_2	-.2278108E-01	.9214504E-01	-.2125022E-01	.1950194E-01	-.5231326E-01
CD8_2	.1307952E-01	.2777337E-02	.2503659E-01	.1017963E-01	-.9921371E-03
MO_2	-.1598712E-01	.1572147	-.3519784E-01	-.4072689E-01	.4064856E-01
IFN_2	-.4060058E-01	-.6753876E-01	.3459994E-01	.3775719E-01	.3605534E-01
IGG_2	.8216899E-01	.5613364E-02	-.1186506E-01	-.6788140E-01	-.1174772
IGA_2	.2616502E-01	-.1596402E-01	-.4404619E-01	.1119271	.2683563E-01
IGM_2	.1925978	-.4589182E-01	-.4596925E-02	-.3845851E-01	.2336025
(constant)	-3.972784	-3.713835	.4476141E-01	-.6783928	-2.473330

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC1	FUNC2	FUNC3	FUNC4	FUNC5
1	.60723	2.85117	1.71839	-.02416	.08513
2	5.30015	-1.27082	-.08363	-.13965	-.14189
3	-2.34422	-2.57950	1.34122	.48281	-.00662
4	-2.46875	.63444	-.67815	-.48193	-.44674
5	-.09871	.98852	-1.58105	.95775	.10019
6	-.99569	-.62381	-.71678	-.79482	.40992

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	FT187.5	7	19.825625
2	FT375	7	21.875245
3	FT750	7	20.497250
4	FM187.5	7	13.378068
5	FM375	7	21.847227
6	FM750	7	13.009572

Pooled Within-Groups
 Covariance Matrix 7 27.684131

Box's M Approximate F Degrees of freedom Significance
 501.05 2.3284 140, 4556.6 .0000

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

On groups defined by KELOMPOK
 Analysis number.. 1
 Number of Canonical Discriminant Functions.. 5
 List of the 7 Variables used.

Variable Label

CD4_2
 CD8_2

MO_2
 IFN_2
 IGG_2
 IGA_2
 IGM_2

Classification Results -

Actual Group	No. of Predicted Cases	Group Membership					
		1	2	3	4	5	6
Group 1	10	9	0	0	0	1	0
FT187.5		90.0%	.0%	.0%	.0%	10.0%	.0%
Group 2	10	0	10	0	0	0	0
FT375		.0%	100.0%	.0%	.0%	.0%	.0%
Group 3	10	0	0	10	0	0	0
FT750		.0%	.0%	100.0%	.0%	.0%	.0%
Group 4	10	0	0	0	10	0	0
FM187.5		.0%	.0%	.0%	100.0%	.0%	.0%
Group 5	10	0	0	0	2	5	3
FM375		.0%	.0%	.0%	20.0%	50.0%	30.0%
Group 6	10	0	0	1	0	0	9
FM750		.0%	.0%	10.0%	.0%	.0%	90.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 88.33%

Classification Processing Summary

60 Cases were processed.

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

0 Cases had at least one missing discriminating variable.

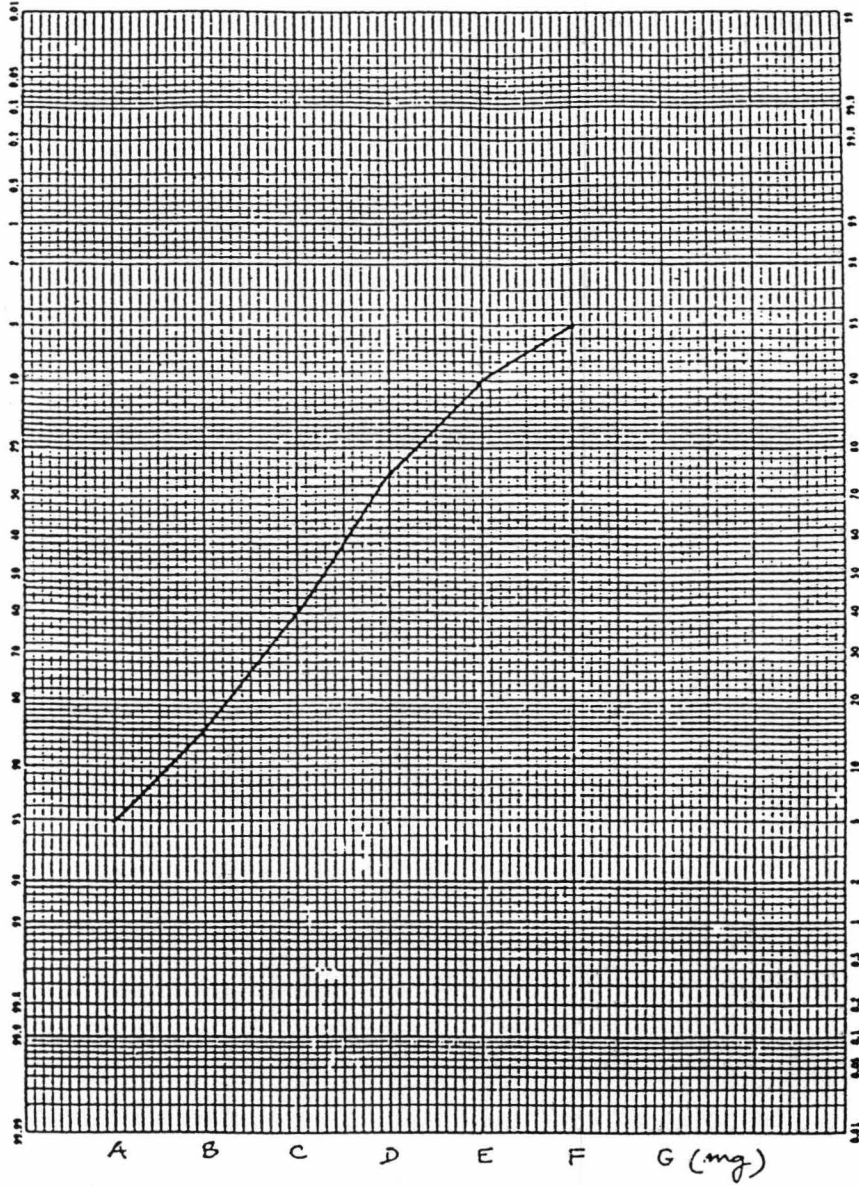
60 Cases were used for printed output.

GRAFIK – GRAFIK

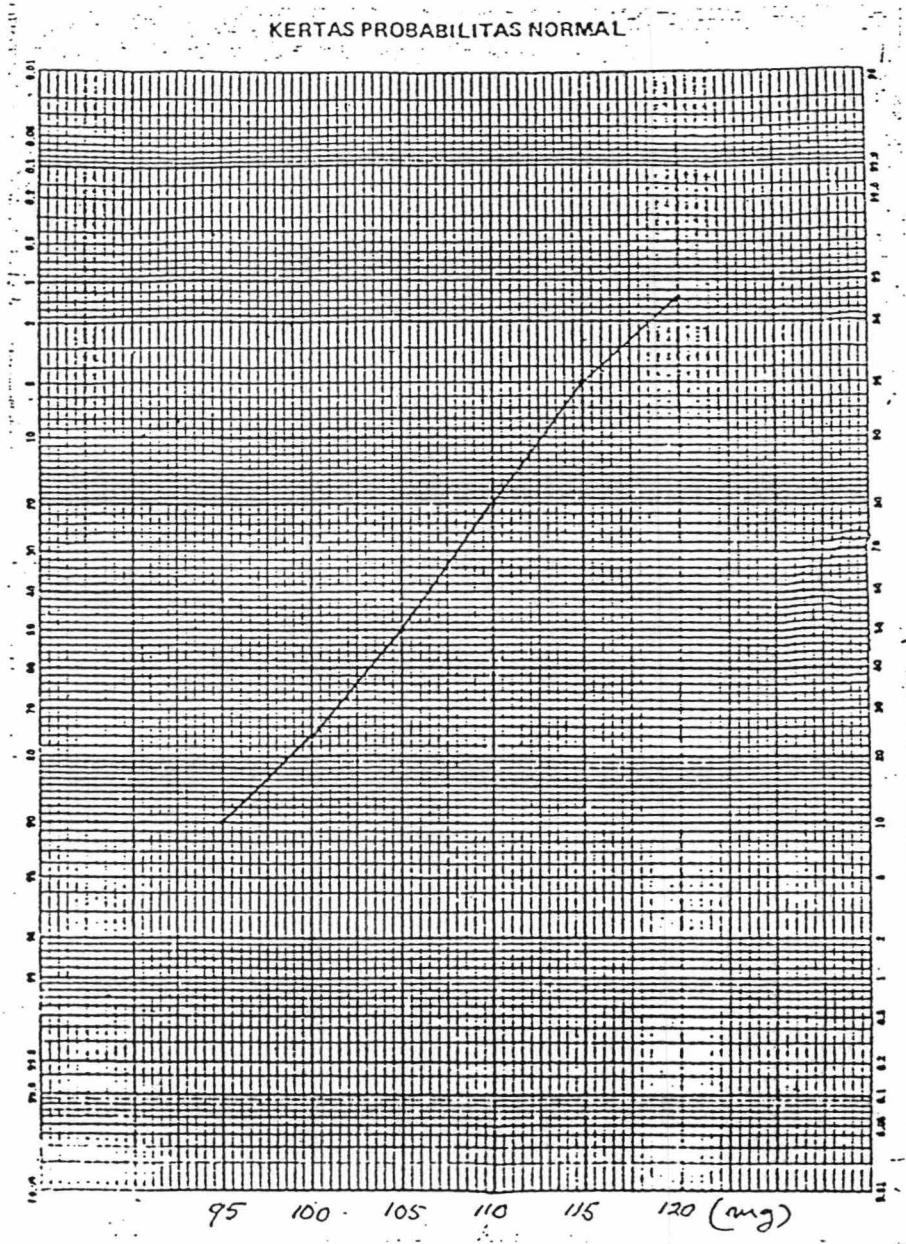
LAMPIRAN 10 A

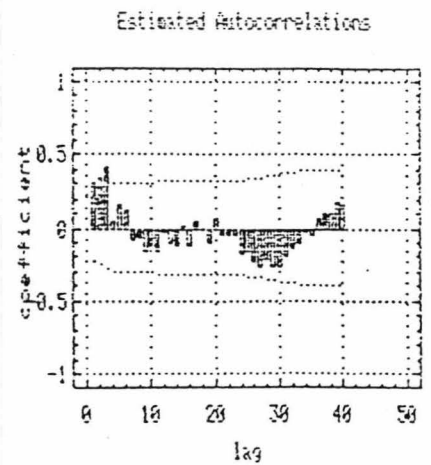
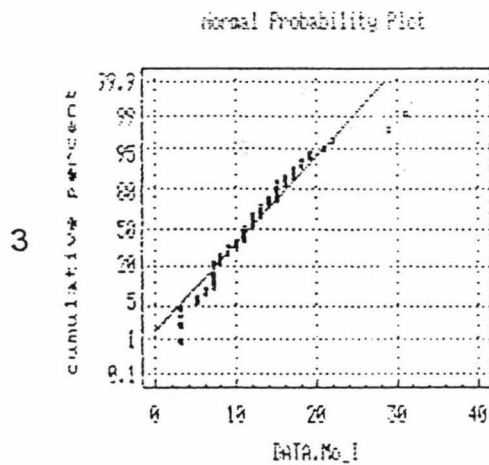
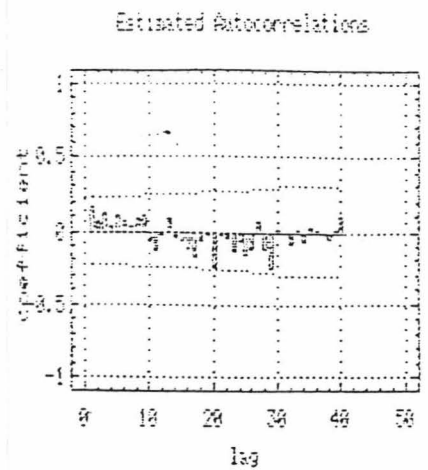
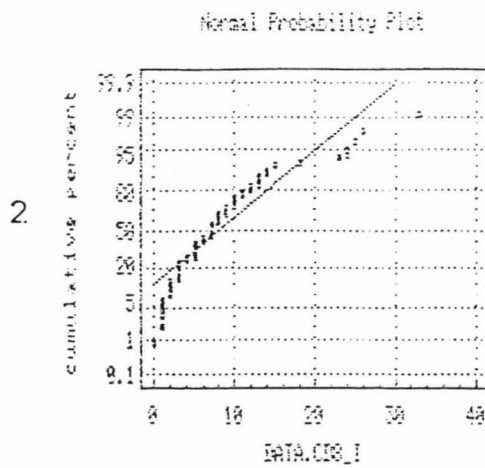
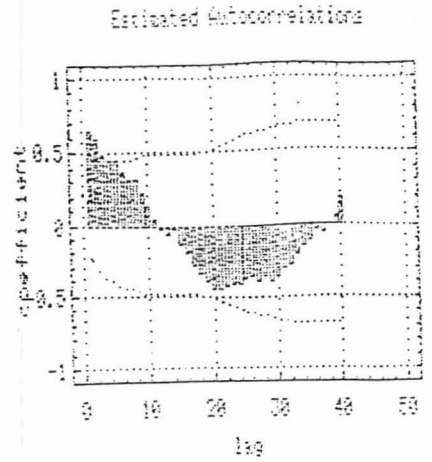
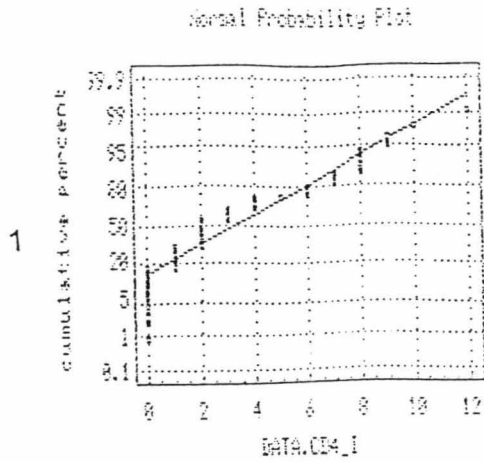
GRAFIK UJI HOMOGENITAS TABLET BERDASARKAN BERAT SEBAGAI SUMBER FTECA

KERTAS PROBABILITAS NORMAL



LAMPIRAN 10B
GRAFIK UJI HOMOGENITAS TIKUS
BERDASARKAN BERAT BADAN

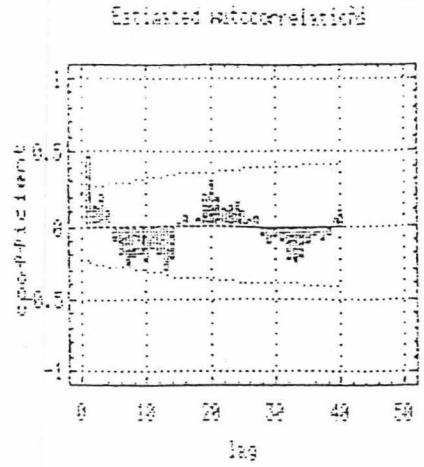
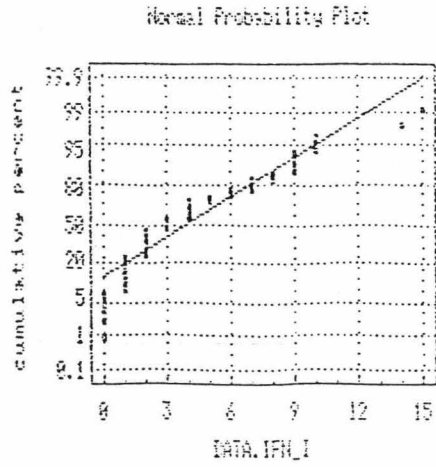




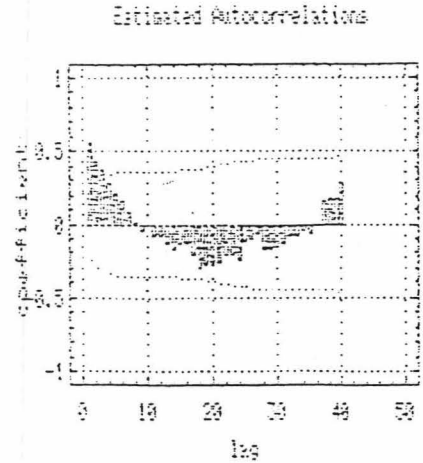
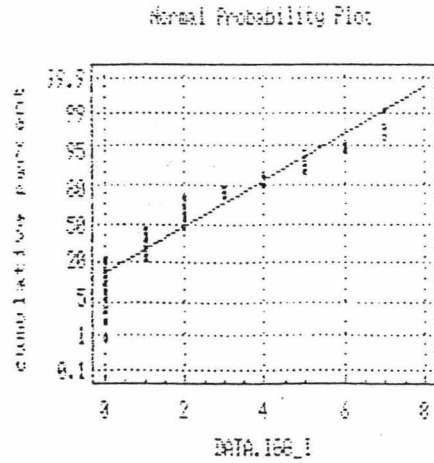
A

B

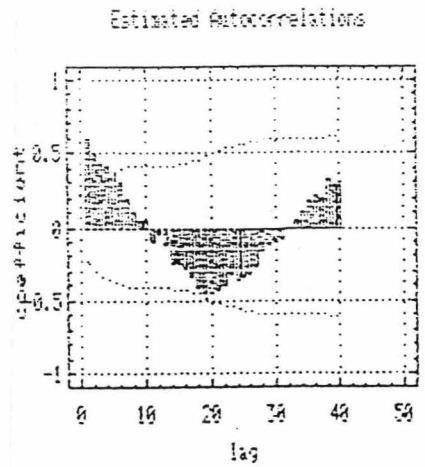
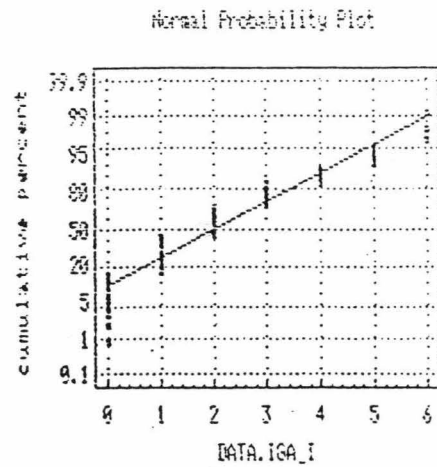
4



5



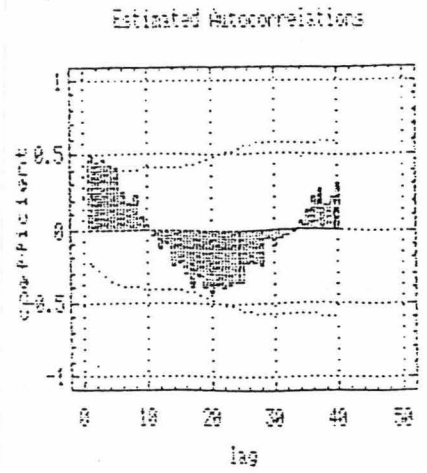
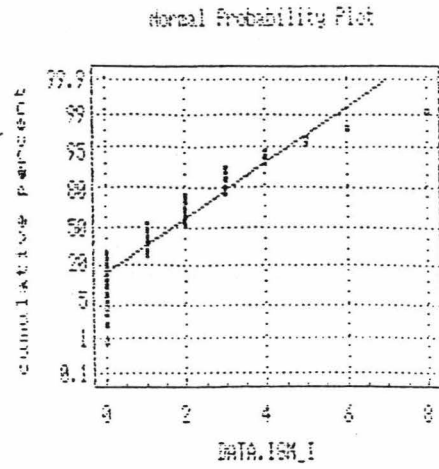
6



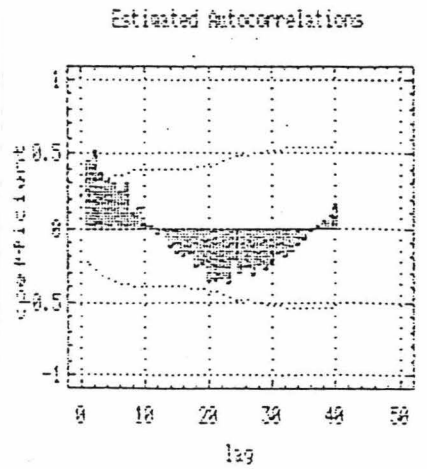
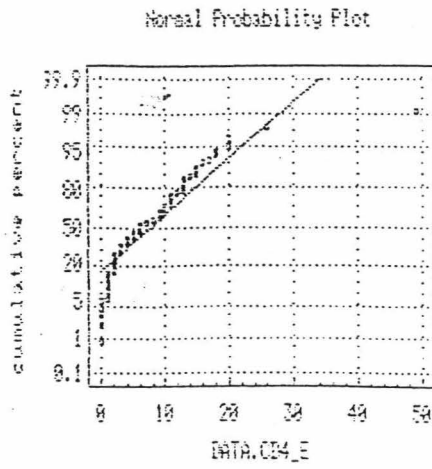
A

B

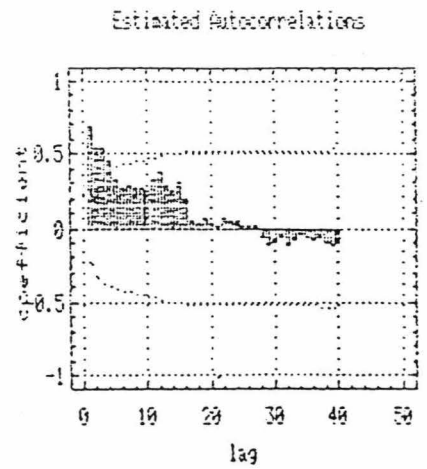
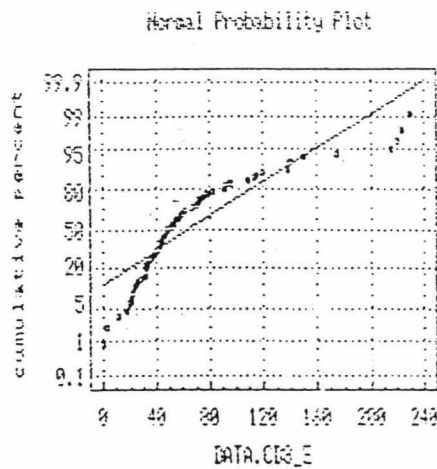
7



8



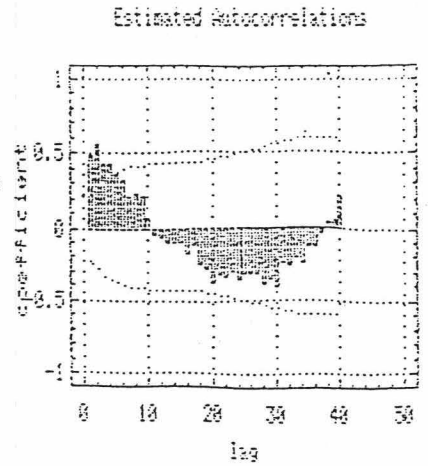
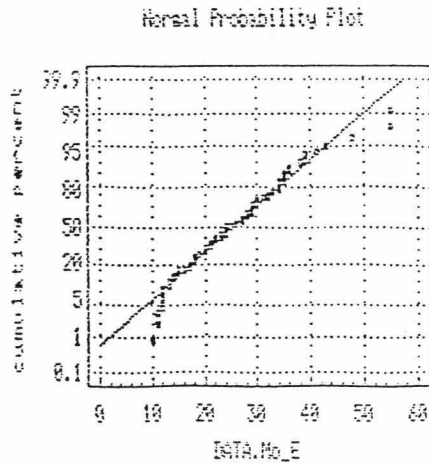
9



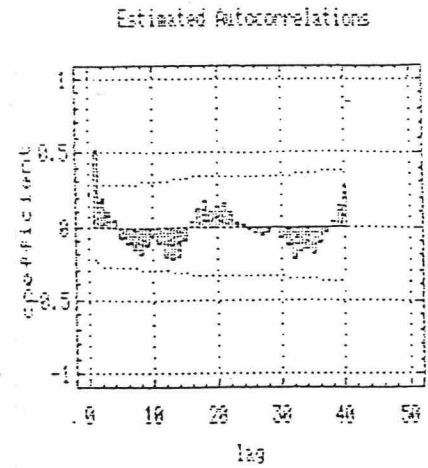
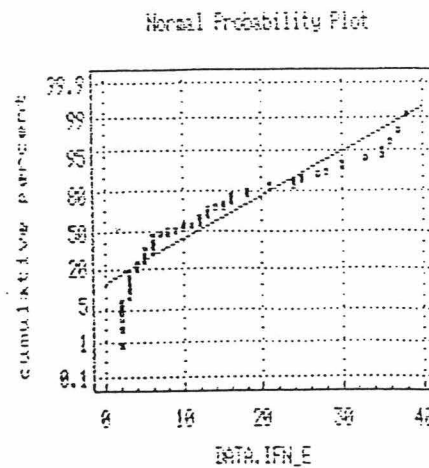
A

B

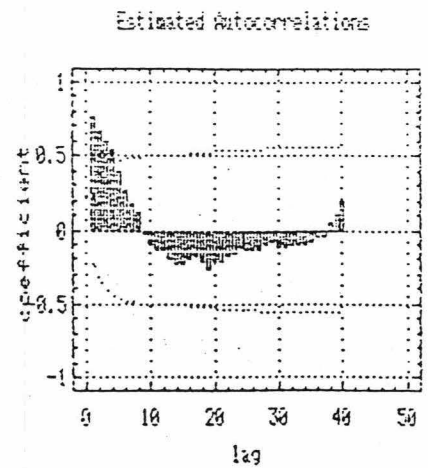
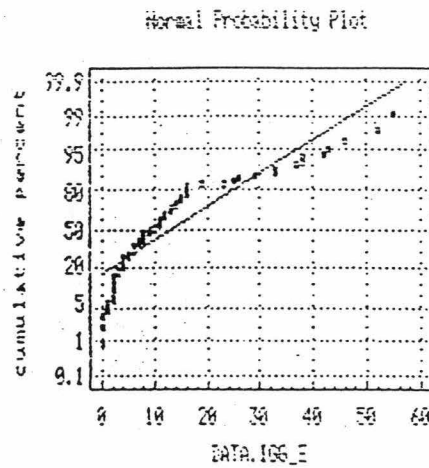
10



11



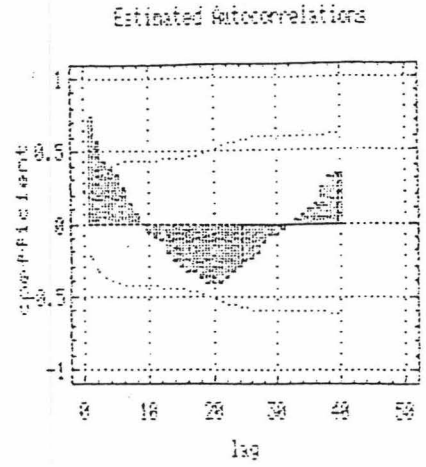
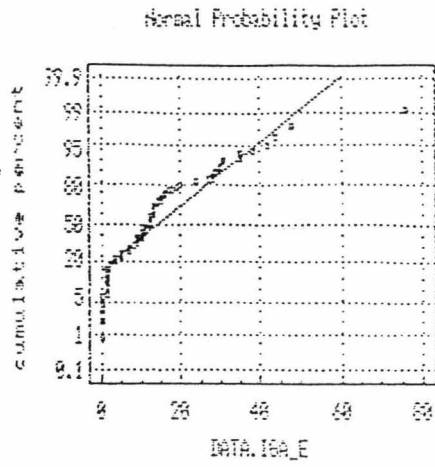
12



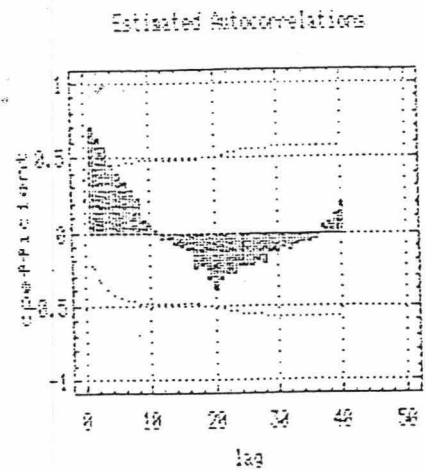
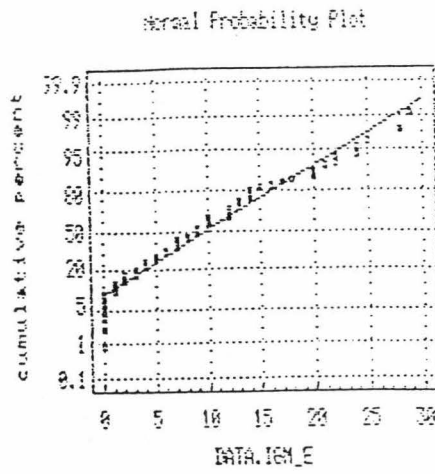
A

B

13



14

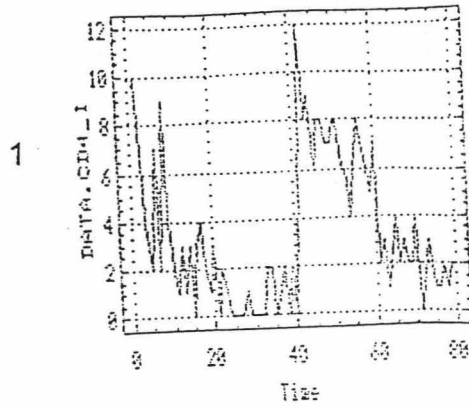


A

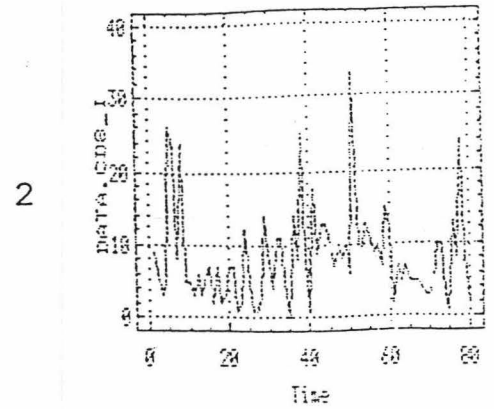
B

GRAFIK UJI NORMALITAS · PENGARUH KONSENTRASI FTECA DAN
FMECA PADA SEKRESI SITOKIN

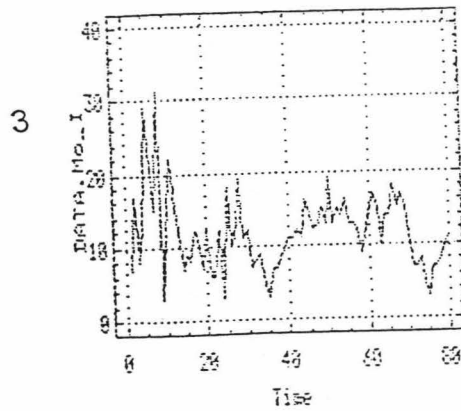
Time Sequence Plot



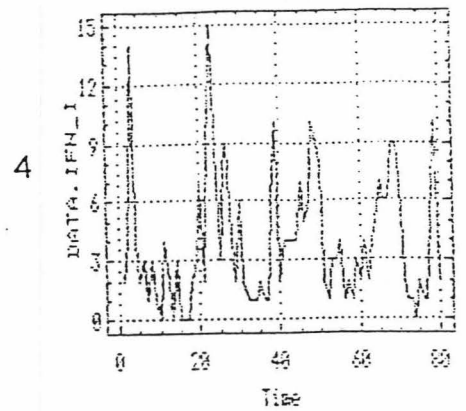
Time Sequence Plot



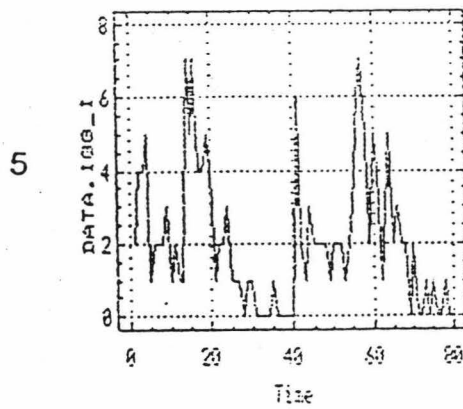
Time Sequence Plot



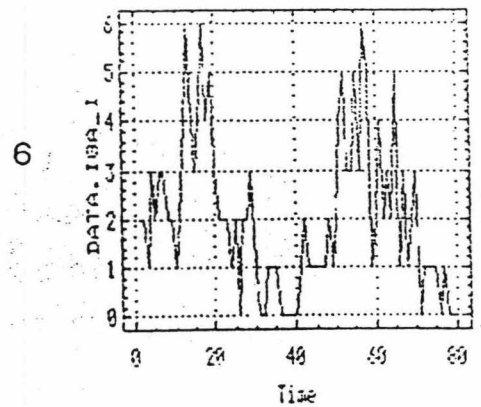
Time Sequence Plot

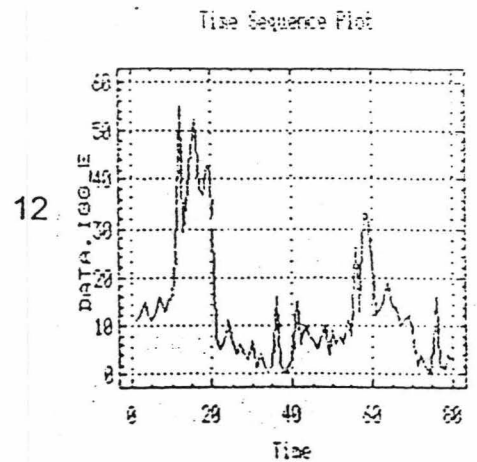
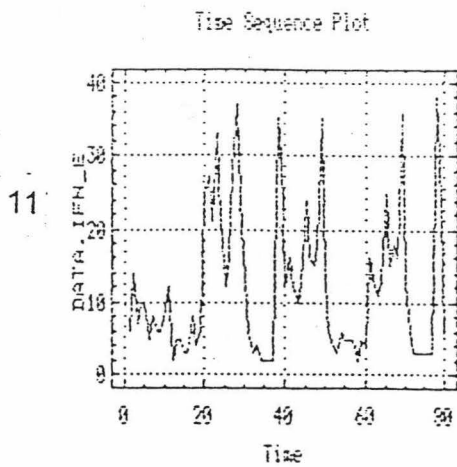
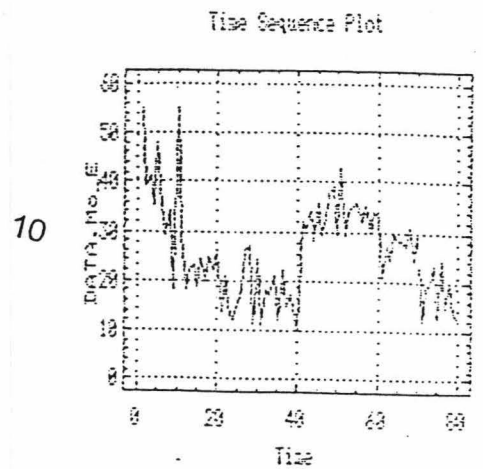
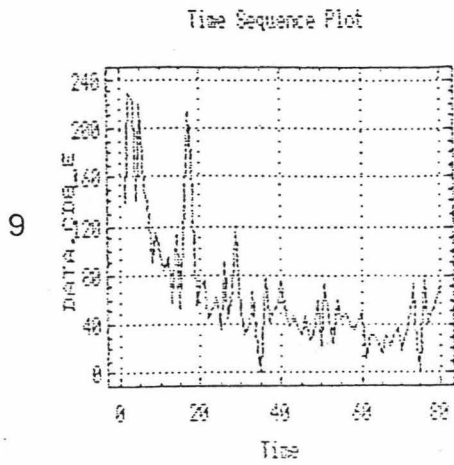
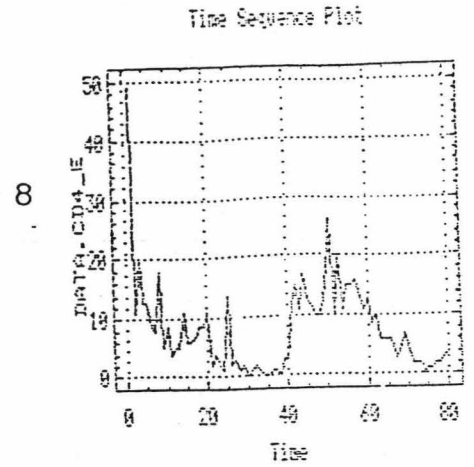
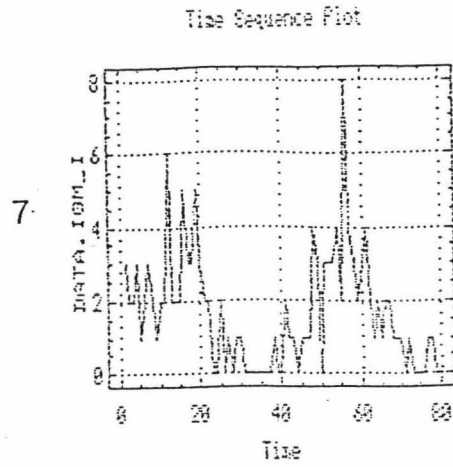


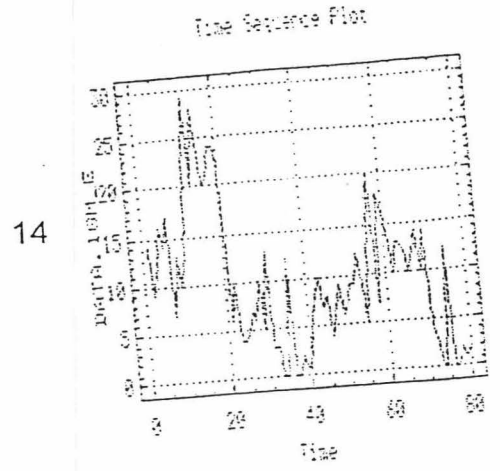
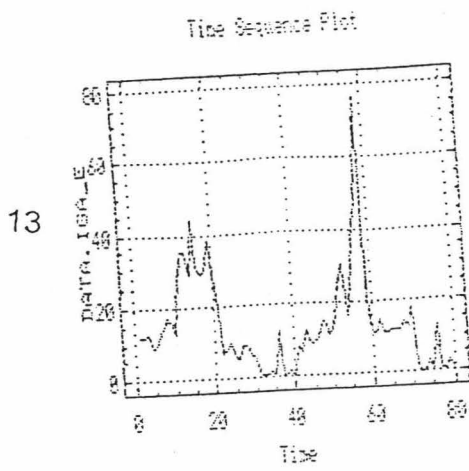
Time Sequence Plot



Time Sequence Plot

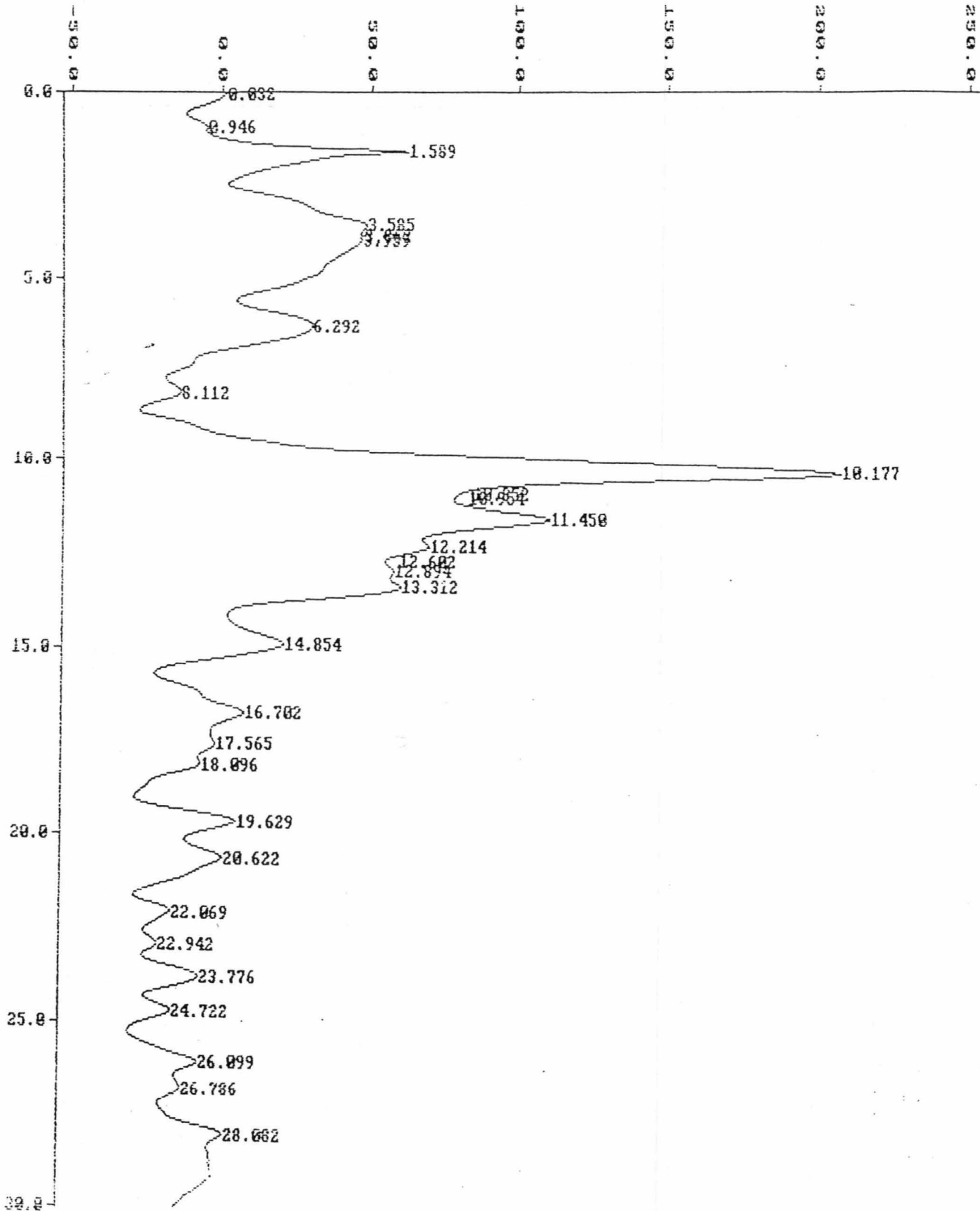






LAMPIRAN
GRAFIK HPLC ASIATICOSIDE,
MADECASSOL (FTECA) DAN
CA MeOH (FMECA).

(ITS-AM59.D01) HV



ITS-AM59.D01

ASIATICOSIDE

01

Type : Sample

C:\VHPLC99

Inst : Model 1022

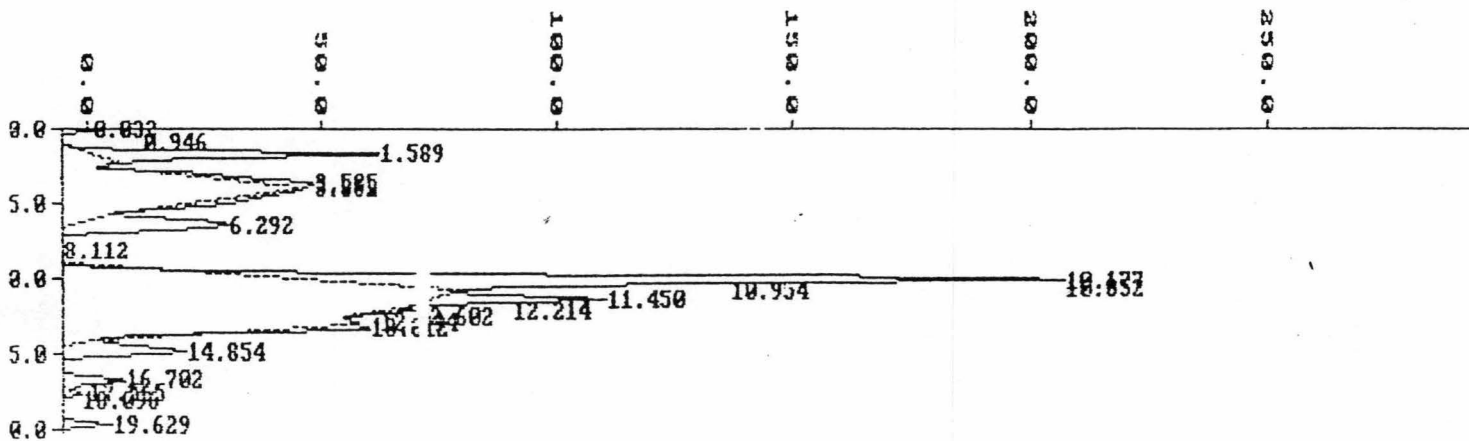
tion : 15:29:56 May 21 1999 Method : MULJA-HS [14:00:48 May 21 1999]
 ation: 15:29:56 May 21 1999 Method : MULJA-HS [14:00:48 May 21 1999]
 : 15:59:59 May 21 1999 Method : MULJA-HS [14:00:48 May 21 1999]

PERCENT (AREA)

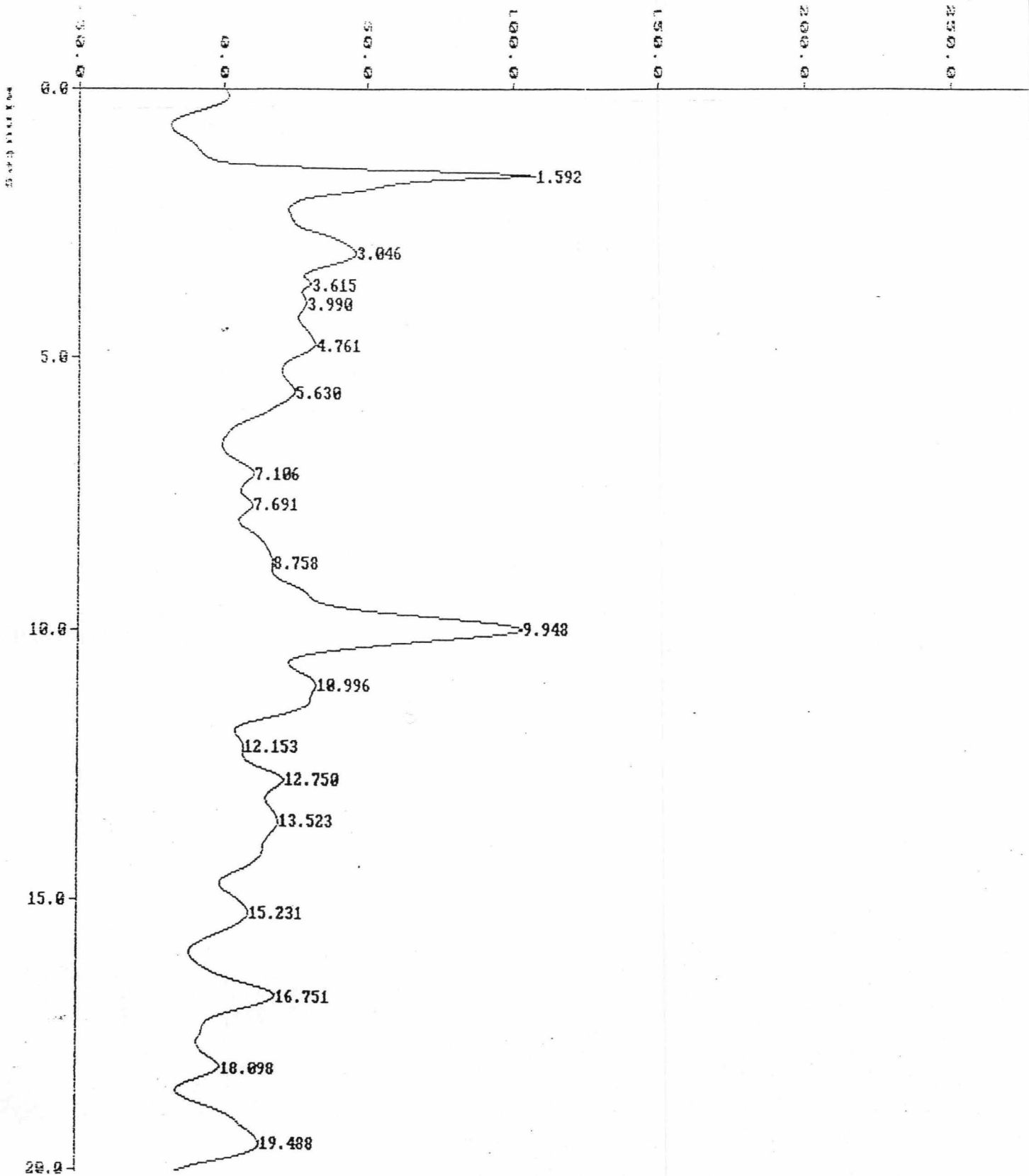
RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
0.032	2434	0.0897		0.0014	0.0177
0.946	32208	0.5207		0.0182	0.1026
1.589	13392288	61.8596		7.5585	12.1880
3.585	4601216	10.3694	V	2.5969	2.0431
3.862	4746	0.2074	V	0.0027	0.0409
3.959	4853088	1.1599	V	2.7391	0.2285
6.292	19123168	32.6174	V	10.7930	6.4265
8.112	2543427	8.7170	V	1.4355	1.7175
10.177	54263616	158.9073	V	30.6261	31.3091
10.852	12118	0.5790	V	0.0068	0.1141
10.934	8604	0.4304	V	0.0049	0.0848
11.450	9967392	37.2882	V	5.6255	7.3468
12.214	1353461	7.2012	V	0.7639	1.4188
12.602	2970	0.1706	V	0.0017	0.0336
12.894	276256	1.9866	V	0.1559	0.3914
13.312	6493672	16.4861	V	3.6650	3.2482
14.854	13637504	30.0997	V	7.6969	5.9305
16.702	7829504	17.7659	V	4.4189	3.5004
17.565	549616	3.1770	V	0.3102	0.6260
18.096	1956480	3.7409	V	1.1042	0.7371
19.629	7320932	24.2797	V	4.1318	4.7838
20.622	8937157	18.0687	V	5.0441	3.5600
22.069	2970640	10.7361	V	1.6766	2.1153
22.942	947904	4.7535	V	0.5350	0.9366
23.776	5943968	18.3158	V	3.3547	3.6087
24.722	3147632	11.2176	V	1.7765	2.2102
26.099	3788160	12.8411	V	2.1380	2.5300
26.785	1164010	4.1698	V	0.6570	0.8216
28.082	2056896	9.7874	V	1.1609	1.9284

7 Peaks > Area Reject 177180960 Total Area
 9 Peaks > Height Reject 507.544 Total Height

(ITS-AM59.D01) MU



(ITS-AM60.D01) AU



: ITS-AM60.D01

adecassol

MULJA RADI SANTOSA

: 01

Type : Sample

: C:\HPLC99

Inst : Model 1022

ction : 16:10:01 May 21 1999 Method : MULJA-HS [14:00:48 May 21 1999]

ration: 16:10:01 May 21 1999 Method : MULJA-HS [14:00:48 May 21 1999]

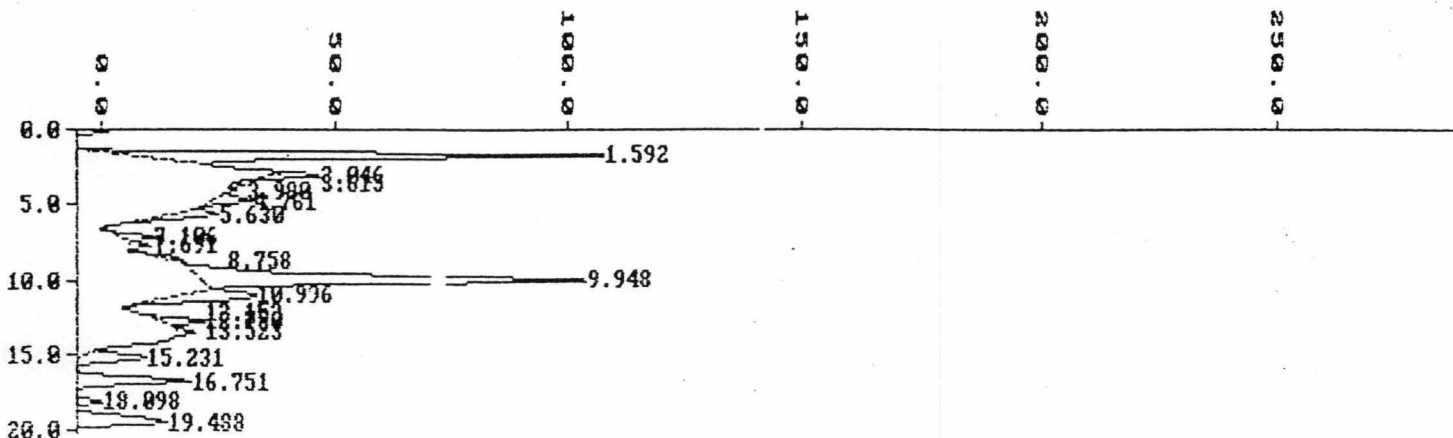
t : 16:40:04 May 21 1999 Method : MULJA-HS [14:00:48 May 21 1999]

PERCENT (AREA)

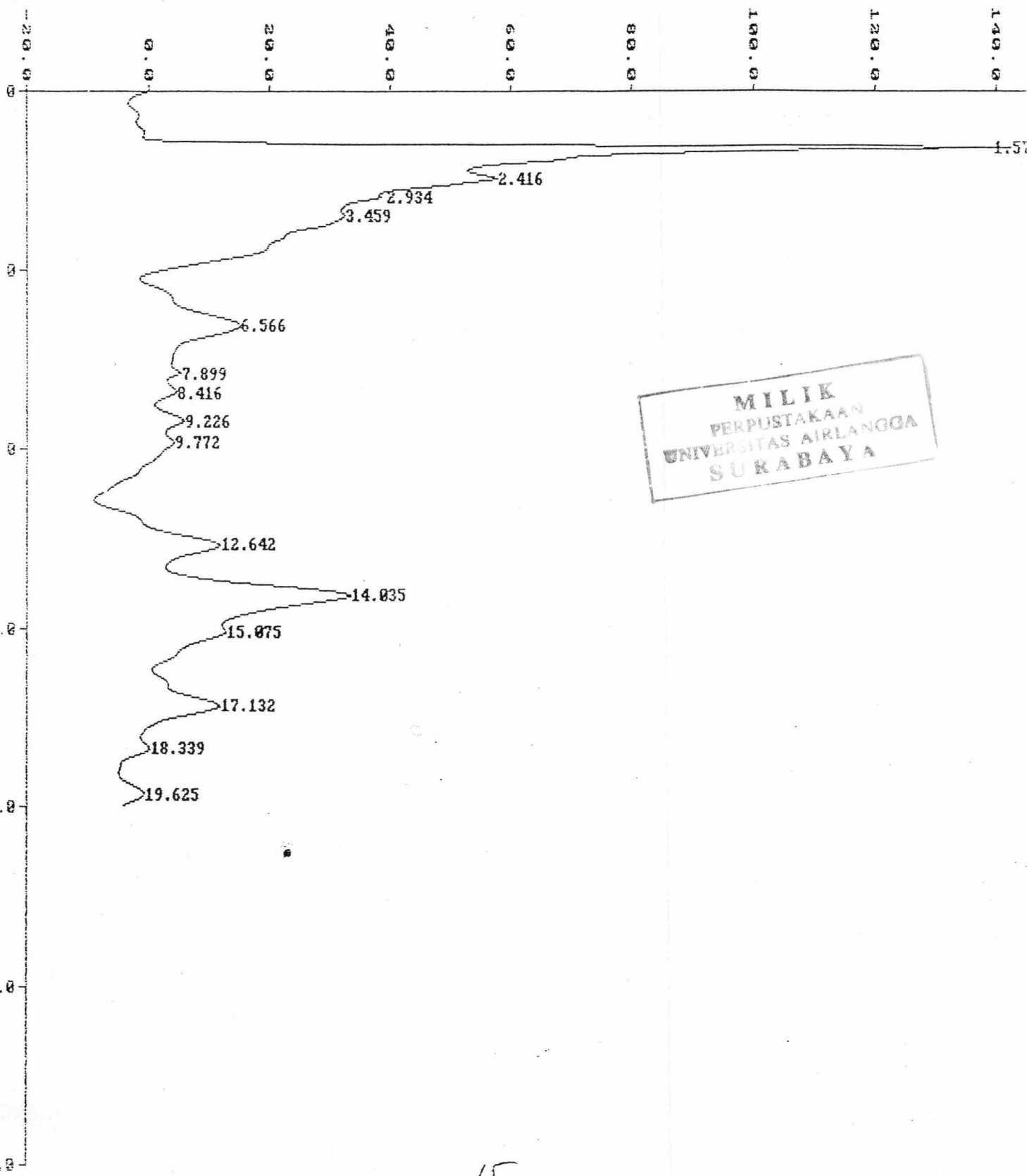
RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1.592	19724832	103.9490	V	14.1658	23.9935
3.046	2333360	10.8237	V	1.6758	2.4983
3.615	239176	2.7629	V	0.1718	0.6377
3.990	281811	1.9607	V	0.2024	0.4526
4.761	2498364	8.8227	V	1.7943	2.0364
5.630	4692848	10.8039	V	3.3703	2.4937
7.106	1554000	6.9515	V	1.1160	1.6045
7.691	761952	4.5476	V	0.5472	1.0497
8.758	880448	0.9997	V	0.6323	0.2307
9.948	29378688	82.6281	V	21.0990	19.0722
10.996	8726269	15.4956	V	6.2670	3.6229
12.153	120008	0.9788	V	0.0862	0.2259
12.749	2022624	9.6097	V	1.4526	2.2181
13.523	861744	3.6891	V	0.6189	0.8515
15.231	5592736	14.3453	V	4.0166	3.3112
16.751	11000000	28.8872	V	7.8999	6.6677
18.098	3294698	11.7121	V	2.3662	2.7034
19.488	15550304	30.9631	V	11.1678	7.1469
21.008	2940736	12.1146	V	2.1120	2.7963
21.558	817108	3.1914	V	0.5868	0.7366
22.248	1515312	6.3610	V	1.0683	1.4682
23.281	683088	2.4785	V	0.4906	0.5721
23.615	2514568	7.2061	V	1.8059	1.6633
24.981	10167212	20.0663	V	7.3018	4.6317
26.775	1299136	5.2148	V	0.9330	1.2037
27.418	954410	4.2487	V	0.6854	0.9807
28.735	6071744	17.0771	V	4.3606	3.9417
29.308	2765060	5.1486	V	1.9858	1.1884

28 Peaks > Area Reject 139242240 Total Area
 28 Peaks > Height Reject 433.238 Total Height

(ITS-AM60.D01) MU



(IIS-AM56.D01) MU



MILIK
 PERPUSTAKAAN
 UNIVERSITAS AIRLANGGA
 SURABAYA

15

HASIL ANALISIS HPLC
LABORATORIUM DASAR BERSAMA UNAIR

File : ITS-AM56.D01 CA Method Sag/ml MULJA HADI SANTOSA
Run : 01 Type : Sample
Path : C:\\$T\$ Inst : Model 1022
Collection : 10:50:23 May 21 1999 Method : MULJA-HS [09:29:12 May 21 1999]
Integration: 10:50:23 May 21 1999 Method : MULJA-HS [09:29:12 May 21 1999]
Report : 11:23:06 May 21 1999 Method : MULJA-HS [10:11:42 May 21 1999]

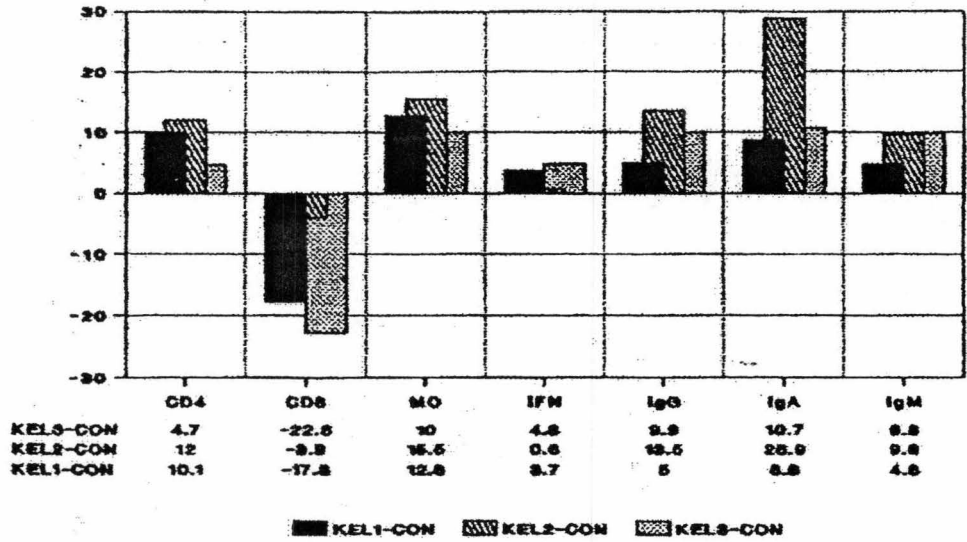
PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	1.574	20338016	126.0703		34.1296	56.6334
2	2.416	1682832	9.6192	V	2.8240	4.3211
3	2.934	304652	1.3263	V	0.5112	0.5958
4	3.459	4790720	3.0934	V	8.0394	1.3896
5	6.566	4525248	11.2596	V	7.5939	5.0580
6	7.899	214766	1.9251	V	0.3604	0.8648
7	8.415	510932	2.3232	V	0.8574	1.0436
8	9.226	779024	3.7298	V	1.3073	1.6755
9	9.772	2187616	2.8164	V	5.6711	1.2652
10	12.642	6007488	13.1774	V	10.0813	5.9196
11	14.035	10246656	26.2118	V	17.1951	11.7749
12	15.075	980784	2.3211	V	1.6459	1.0427
13	17.132	5140736	12.2665	V	8.6268	5.5104
14	18.339	816192	2.5364	V	1.3697	1.1394
15	19.625	1064832	3.9313		1.7869	1.7660

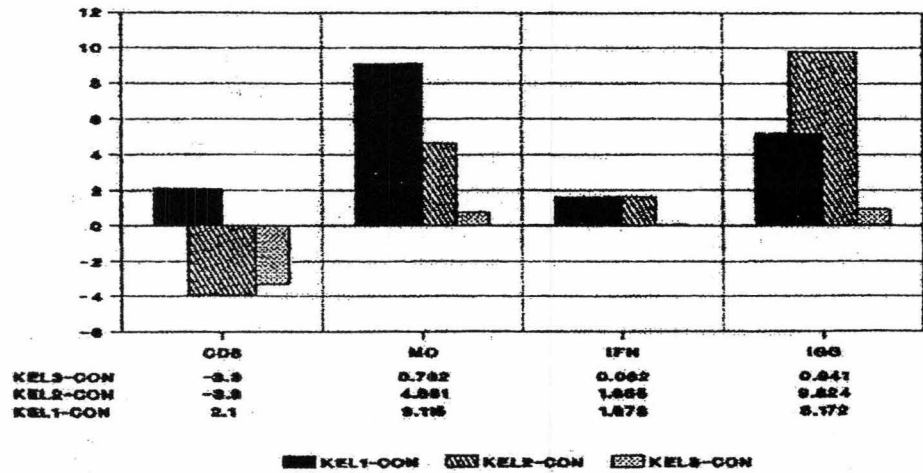
15 Peaks > Area Reject 59590496 Total Area
15 Peaks > Height Reject 222.609 Total Height

LAMPIRAN 11

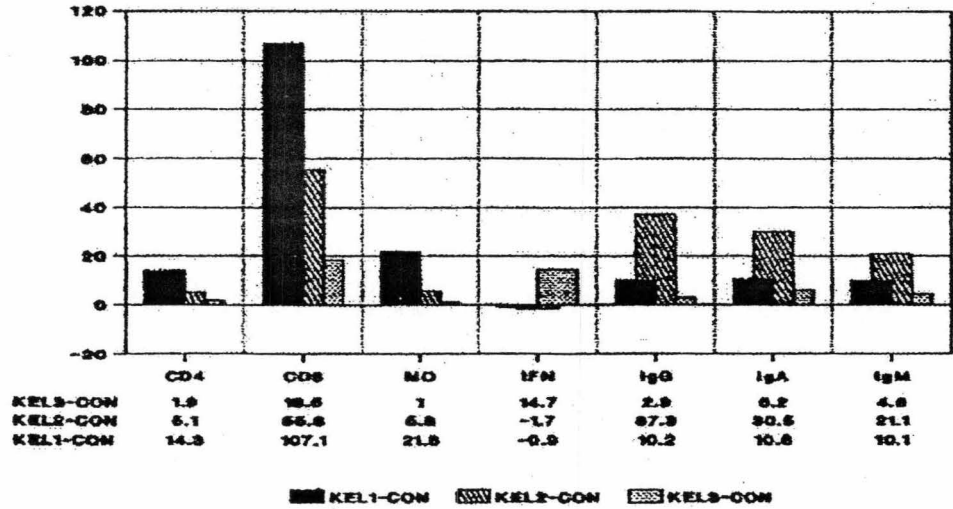
GRAFIK 1
 Grafik rerata ke tujuh variabel dari daerah
 PARAKORTEKS grup EMCA



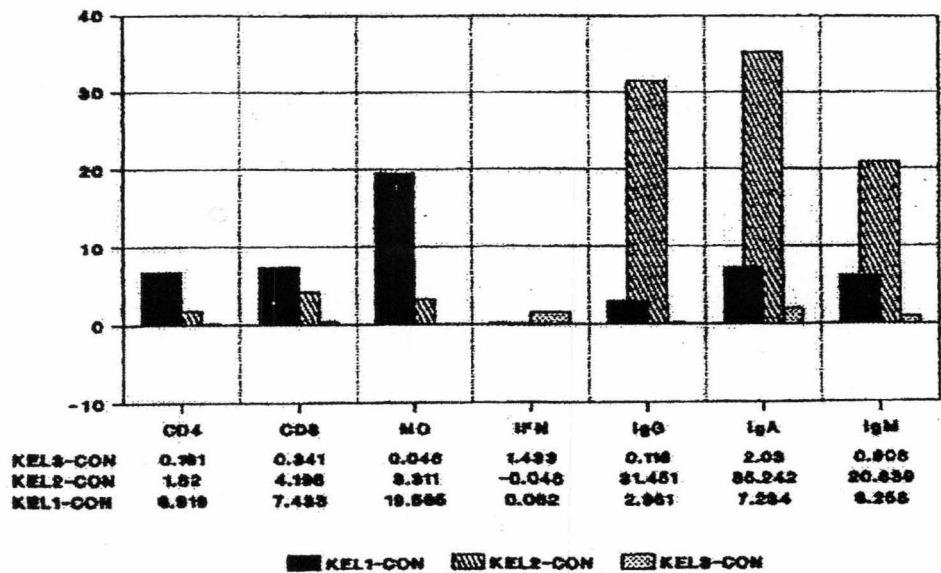
GRAFIK 2
 Grafik pola ke tujuh variabel dari daerah
 PARAKORTEKS grup EMCA



GRAFIK 3
 Grafik rerata ke tujuh variabel dari daerah
 PARAKORTEKS grup FTECA



GRAFIK 4
 Grafik pola ke tujuh variabel dari daerah
 PARAKORTEKS grup FTECA



PERSIAPAN
DAN
TEKNIK PEMERIKSAAN

LAMPIRAN 12
PERSIAPAN BAHAN PENELITIAN EMCA

1. Limapuluh kg daun pegagan basah dari Materia Medika Batu-Malang, dianginkan di tempat terbuka/terlindung sinar matahari selama 7 hari dan diperoleh 5 kg daun kering. Setelah itu daun kering di giling menjadi serbuk.
2. Satu kg serbuk pegagan, masukkan ke dalam wadah kaca yang mempunyai stop kran pada bagian bawah dan terbuka bagian atas. Tambahkan 2,5 liter metanol, kemudian diaduk sedikit dan selanjutnya bagian atas botol kaca ditutup, biarkan selama 3 hari. Pada hari ketiga larutan ekstrak metanol dialirkan dan ditampung di dalam gelas beker. Selanjutnya tambahkan metanol, hingga seluruh etanol yang diper- gunakan berjumlah 7,5 liter.
3. Bahan kental diperoleh , setelah diuapkan dengan memakai alat *rotary evaporator Büchi R-114* dibantu *waterbath Büchi 480* dan alat pengukur tekanan gas dalam labu *Büchi -B-* sampai diperoleh bahan kental ber- warna hijau tua seberat 495 gram.
4. Kemudian 250 gram bahan tadi, dikeringkan dengan menggunakan alat pengering vakum dingin (*freeze dryer*). Kalau perlu tambahkan air untuk membantu mempercepat pengeringan, biasanya memerlukan waktu 10-14 jam. Akhirnya diperoleh serbuk kering *Centella asiatica* sebanyak 8,75 gram yang berwarna coklat untuk penelitian.
5. Untuk membuktikan, di dalam ekstrak metanol *Centella asiatica* juga terdapat komponen *asiaticoside*, *asiatic acid* dan *madecassoside*, lakukan analisis dengan alat *high pressure liquid chromatography (HPLC)* buatan Perkin Elmer Corp.USA.
Pelaksanaan HPLC sebagai berikut: ambil masing-masing 100 µl asiati- coside atau 100 µl madecassol (FTECA) atau 5 mg EMCA larutkan dalam campuran air distilasi /H₃PO₄ (85%) diinjeksikan pada kolom C₁₈. Kolom C₁₈ merek SEP-PAK sebagai (fasa diam) diproduksi Waters Associates- Maple Street Milford USA. Fasa gerak adalah suatu campuran etil asetat / metanol (700:200) dan air distilasi /H₃PO₄ (85%), kedua larutan akan dicampur oleh pompa Elmer dan atur kecepatan aliran 1 ml / menit. Hasilnya dibaca pada panjang gelombang 200-240 nm. Dengan membandingkan grafik HPLC ketiga zat tersebut dapat diketahui waktu retensi komponen di dalam larutan. Zat sama mempunyai waktu retensi sama. Pemisahan yang baik apabila komponen yang terdapat di dalam larutan saling terpisah secara maksimal tetapi tiap komponen tadi tidak menyebar lagi selama bergerak dalam kolom. Pemisahan ditentukan oleh fasa bergerak dan fasa diamnya, tetapi penyebaran pita komponen yang terpisah ditentukan oleh sifat fasa diam. Supaya penyebaran pita minimal maka partikel fasa diam dibuat sekecil mungkin dan seseragam / se homogen mungkin Namun semakin kecil partikelnya, tahanan aliran semakin besar. Partikel juga harus mampu menahan tekanan besar selama pelaksanaan pemisahan. Tak ada alat pemisah yang betul-betuil sempurna, karena faktor pilihan fasa diam, ukuran dan bentuknya dan fasa bergeraknya, maka hasil akhir merupakan kompromi dari faktor-faktor diatas (Sudarmadji S, 1996). Jika bahan yang diteliti terdapat komponen yang sama dengan yang terdapat pada larutan kontrol, maka waktu yang diperlukan oleh kedua komponen tersebut untuk bergerak akan sama pula. Waktu yang sama ini disebut *waktu retensi*, yaitu waktu yang diperlukan suatu komponen untuk bergerak pada fasa diam, karena terbawa gerakan fasa gerak.
Dengan teknik separasi, fasa diam maupun fasa gerak yang sama, maka dua komponen yang sama mempunyai *waktu retensi* yang sama pula. Pembuktian ini penting, karena ketiga komponen tadi diasumsikan sebagai bahan aktif yang dapat menstimulasi respon imun. Jika ketiganya dijumpai pada EMCA dan FTECA, maka pada lembar pencatat, dapat dilihat puncak-puncak kurva yang terbentuk pada waktu yang sama atau hampir mendekati sama.
6. Timbangan mikro merek Shimatzu, Libror -Direct reading micro balance LM-20. Dipergunakan untuk menimbang bahan perlakuan EMCA dan FTECA yang akan diberikan pada tikus per oral.
7. Untuk kelompok VI konsentrasi bahan perlakuan 187,5 µg EMCA dan ekuivalen dengan 3750 µg berat tablet FTECA untuk kelompok IX (1 tablet seberat 200 mg, mengandung 10 mg FTECA murni). Kelompok VII mendapat bahan perlakuan 375 µg EMCA dan ekuivalen dengan 7500 µg tablet FTECA untuk kelompok X. Kelompok VIII EMCA 750 µg ekuivalen dengan 15000 µg tablet FTECA.
8. Pada waktu perlakuan dan kontrol positif akan diberikan, terlebih dahulu EMCA dan FTECA dalam jumlah tertentu dilarutkan dalam larutan garam faali (normal salin). Setelah itu 1,5 ml larutan garam normal yang mengandung 187,50 µg diberikan pada tikus dari kelompok VI, diberikan 375 µg untuk kelompok VII dan 750 µg per oral untuk kelompok VIII EMCA. Larutan FTECA di dalam garam faali harus didiamkan lebih dahulu supaya bahan pengisi tablet mengendap seluruhnya, selanjutnya cairan bening yang terletak diatas endapan diambil untuk diberikan pada tikus. Dengan

demikian dapat diberikan FTECA konsentrasi 187,50 µg, konsentrasi 375 µg dan konsentrasi 750 µg per 1,5 ml larutan.

B. Persiapan FTECA

Fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica*, untuk kontrol positif diperoleh dari 20 tablet madecassol dengan berat 200 mg per tablet yang diproduksi Corsalaboratories Indonesia dibawah lisensi La Roche laboratories Perancis dengan nomor registrasi D.7813127. nomor batch 1751-DL. Setiap tablet direkomendasikan berisi atau mengandung 10 mg zat aktif yang terbagi atas *asiaticoside* 40% (4 mg), *asiatic acid* 30% (3 mg) dan *madecassoside* 30% (3 mg). Bubuk FTECA yang diperoleh dari gerusan tablet ditimbang dalam berat tertentu sesuai dengan konsentrasi obat yang akan diberikan. Perlu dilakukan penyesuaian jumlah EMCA dan FTECA yang diberikan. Bila diasumsikan jumlah ketiga komponen aktif yang terkandung di dalam FTECA sama dengan EMCA, maka setiap 1 µg EMCA mengandung komponen aktif yang seimbang atau setara dengan 20 µg tablet FTECA.

LAMPIRAN 13

PERSIAPAN REAGEN KIMIA DAN PERALATAN

A. Reagen kimia

1. Antibody diluent - Dako code: 83022 Lot: 098-2, Made in USA, Dako Company
2. Kit peroxidase - Dako LSAB, terdiri dari:
 - a. Link antibody peroxidase biotinylated antimouse, anti rabbit and anti goat immunoglobulin.
 - b. streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in PBS, canin protein and an antimicrobial agent. For use in Dako immuno- enzymatic.
Dako liquid DAB substrate, chromogen system for laboratory terdiri dari: Buffered substrate code K 3466 dan DAB chromogen code K 3466
3. Sigma - monoclonal anti rat IgM. Clone RTM - 32 - mouse ascites fluid. Lot 81 H 4840
4. Sigma Monoclonal anti rat IgG₁ - mouse ascites fluid. Clone R6-88 and B 7638 Rabbit Pab, anti rat- INF gamma. Catalog: ARC 4833. Lot 2975-01S
5. Pharmingen, Purified anti rat macrophage cell, Catalog 22649 D. Lot Mo 18127
6. Pharmingen, Purified anti rat dendritic cell, Catalog 22651 D. Lot Mo 18138
7. Mouse mAb anti rat, T cells CD4; Catalog: ARS 0401 (RS-CD4-UN). Lot number : 2440-06S Clone: W3 /25
8. Mouse mAb anti rat, T cells CD8 Catalog: ARS 0801;(RS- CD8-UN). Lot number: 3698-12S; Clone: MRC OK-8
Semua bahan pewarna, sitokin disimpan di lemari pendingin.
9. Aqua bidestilata steril nonpyrogen, produksi PT. Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories-Jakarta Indonesia dengan Reg. no.D 2018 020-iv dan batch no. 270712 D
10. H₂NaPO₄ dan HNa₂PO₄ sebagai bahan untuk membuat larutan dapar PBS.
11. Alkohol PA 2,5 ltr diproduksi oleh Merck's pharmaceutical laboratories.
12. Air kran yang mengalir

B. Peralatan penunjang

1. Lemari pendingin untuk menyimpan bahan serta reagen kimia untuk pewarnaan.
2. Rak untuk melakukan pengecatan serta pipet dan kertas parafin untuk menutup zat warna imunohistokimia yang telah disiapkan untuk pewarnaan dan dilengkapi dengan penutup kaca, untuk mencegah penguapan pada waktu proses pewarnaan. Dilengkapi dengan pipet dan tabung reaksi sesuai dengan keperluan.
3. Malam (wax) untuk membatasi bahan yang akan diwarnai, supaya zat warna tidak mengenai bahan lain.
4. Prosedur baku untuk teknik pewarnaan sitoimunokimia.
5. Mikroskop cahaya dipinjam dari Laboratorium histologi FK. Unair dengan nomor Nikon S-KT 7 - 123387 yang dilengkapi dengan lensa 2 buah pembesaran 10 X dan lensa objektif 5, 10, 40, 100 ; 110 volt dengan nomor registrasi PDK/ PT. 03-02-221.1800. 579/NK/78/P4T.
6. Gratikulae atau mikrometer dengan kotak 0,5 X 0,5 mm
7. Buku / kertas serta peralatan pencatat lainnya.

LAMPIRAN 14 TEKNIK PEMBUATAN SEDIAAN OBJEK GLAS

Jaringan limfoid kelenjar getah bening dari kelompok perlakuan, dan kontrol sebelumnya diambil, harus memenuhi persyaratan dengan cara sebagai berikut:

1. Usahakan manipulasi terhadap kelenjar getah bening seminimal mungkin (Cottier, 1973) dan diberi label yang jelas, pada setiap tempat penyimpanan (Sheehan, 1973).
2. Kelenjar getah bening berbentuk bulat diiris pada sumbu panjang. Tujuan untuk memperoleh variabel penelitian sebaik mungkin, seperti folikel kortek dan parakortek dan medula kelenjar getah bening (Wilkinson 1974)
3. Kelenjar getah bening untuk pemeriksaan imunohistokimia, dapat disiapkan dalam bentuk blok parafin atau jaringan segar. Untuk uji penanda sel (*marker*) atau untuk mengukur kadar imunoglobulin blok parafin dapat dipergunakan, sedangkan untuk menentukan kadar sitokin, dianjurkan memakai jaringan segar sebab sediaan blok parafin dapat merusak protein. Penelitian ini memakai kelenjar getah bening dalam blok parafin. Pengambilannya sebagai berikut:
 - a. kelenjar getah bening mesenterium diambil dari tikus melalui operasi dengan menggunakan peralatan: pinset, scalpel, gunting dan timbangan, toples bertutup ulir. Kapas, ether. Tikus di dalam toples dinarkose. Kemudian ditelentangkan pada tempat yang telah disediakan untuk diambil KGB, setelah di buka abdomen melalui garis medial.
 - b. Kelenjar getah bening tikus, diambil saat operasi dan langsung di awetkan dalam formalin 10% dan disimpan dalam botol plastik bertutup ulir atau botol bersih bekas obat suntik.
 - c. Selanjutnya kelenjar getah bening disayat tipis-tipis. Sayatan kelenjar getah bening dikerjakan oleh Drs. Eko di Laboratorium Onkologi dibawah pimpinan dr. Ario Djatmiko di jalan Sumbawa. Usahakan supaya sayatan microtom mempunyai tebal 3 - 4 μm , kira-kira setebal satu sel, dengan tujuan supaya tidak terjadi tumpang tindih sel pada saat pewarnaan. Kelenjar getah bening yang dibuat sayatan berasal dari 110 ekor tikus yang ikut dalam penelitian.
 - d. Setiap tikus diambil 3-4 buah KGB, tetapi hanya 1 KGB yang dipergunakan untuk membuat 15 slide, supaya tidak terjadi bias bila lebih dari satu KGB dipergunakan. Jadi semua slide yang siap di warnai berjumlah $110 \times 15 \text{ slide} = 1650$.
 - e. Penelitian ini hanya menggunakan 70 ekor tikus yaitu 30 ekor tikus untuk perlakuan FTECA atau 90 objek gelas, 30 ekor tikus untuk perlakuan EMCA atau 90 objek gelas dan 10 ekor tikus untuk kontrol atau 30 objek gelas dan seluruhnya diperlukan 210 objek gelas dengan jumlah pengamatan ($30 \times 14 + 30 \times 14 + 10 \times 14 = 980$ pengamatan, (7 variabel daerah jerminal senter FTECA, 7 variabel daerah PARAKORTEKS FTECA dan 7 variabel daerah jerminal senter FTECA dan 7 variabel daerah PARAKORTEKS FTECA). Dengan tingkat kesulitan yang cukup tinggi, maka paling banyak 5 objek gelas yang dapat dibaca per hari, sehingga keseluruhan objek gelas dapat dibaca antar 21 hingga 30 hari, malahan peneliti hanya sanggup membaca dalam waktu 2-3 bulan.
 - f. Sebelum diberi zat pewarna imunohistokimia, sayatan kelenjar getah bening diletakkan pada objek gelas yang telah di olesi dengan poli-L-lisine, supaya tetap melekat pada saat pewarnaan.

LAMPIRAN 15 TEKNIK PEWARNAAN IMUNOHISTOKIMIA DAN PENILAIAN HASIL PEWARNAAN

A. Pembuatan preparat dari blok parafin (Deparafinisasi)

Dibawah supervisi Dr dr Watadianto MS, dilakukan pewarnaan imunohisto- kimia. Kelenjar getah bening yang semula berbentuk blok parafin dilakukan deparafinisasi sebagai berikut:

1. Sediaan di rendam dalam Xylol : 3 kali@ 5 menit
 di rendam dalam alkohol PA, 2kali..... @ 3 menit
 di rendam dalam alkohol 95%, 2X@ 3 menit
 di rendam dalam alkohol 80%, 2X@ 3menit
 di rendam dalam alkohol 70%,2X.....@ 3 menit
 di rendam dalam air selama 3 menit
2. Sediaan, kemudian di rendam dalam larutan PBS selama 5 menit dan selanjutnya
3. Sediaan ditetesi dengan tripsin selama 6 menit, setelah itu sisa tripsin di lap dengan kertas tisu
4. Sediaan yang terdapat pada objek gelas dipagari dengan Dako pen supaya reagen yang ditetaskan dapat berkumpul pada tempat yang diinginkan. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi dengan malam batik. Setelah itu sediaan di rendam kembali dengan larutan PBS selama 5 menit

5. Selanjutnya sediaan ditetesi dengan H_2O_2 3% dalam waktu 5 menit, kemudian sediaan di guyur pelan pelan dengan larutan PBS dan selanjutnya di rendam dalam larutan PBS 2X dengan waktu masing 5 menit (Mayer RJ, 1987).
6. Sediaan sekarang sudah siap untuk diberi antibodi monoklonal (antibodi primer) menurut pengalaman lamanya pemberian Ab monoklonal (mAb primer) tidak selalu sama untuk setiap sediaan. Diperlukan latihan dan penelitian tersendiri untuk memperoleh waktu yang tepat. Pada penelitian ini waktu yang diperlukan supaya mAb primer dapat melekat pada reseptor membran sel berkisar 30 menit hingga 45 menit. Untuk menghemat bahan, maka dilakukan pengenceran sebagai berikut:

IgG pengenceran 1 : 10	CD4 pengenceran 1 : 10
IgM pengenceran 1 : 10	CD8 pengenceran 1 : 10
M \emptyset pengenceran 1 : 10	IFN- γ pengenceran 1 : 10
Dendritik sel pengenceran 1 : 10	

 Kadang kadang pengenceran dapat lebih encer lagi, misalnya: 1 : 20 atau 1 : 50 apabila didapatkan lebih banyak reseptor pada membran sel. Karena itu perlu dilakukan pewarnaan perco-baan terlebih dahulu.
7. Setelah menetes sediaan dengan mAb primer dan setelah menunggu selama kurang lebih 30 atau 45 menit, sediaan dicuci dengan larutan PBS sebanyak 2 X dengan waktu @ 5 menit
8. Sekarang sediaan siap untuk ditetesi Ab sekunder (LINK). Diperlukan waktu 15 menit supaya Ab sekunder dapat melekat dengan sempurna pada Ab primer. Setelah itu dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 2X @ 5 menit dengan tujuan menghilangkan sisa-sisa Ab sekunder bebas.
9. Setelah itu sediaan ditetesi dengan streptavidin selama 15 menit. Sediaan dicuci kembali dengan larutan PBS 2X dengan waktu @ 5 menit.
10. Selanjutnya sediaan ditetesi dengan zat pewarna atau chromogen, dengan perbandingan chromogen - substrat = 1 : 40. Pada penelitian ini digunakan DAB (diazabicyclooctane) sebagai zat pewarna yang tahan lama (Dako corp. 1997)
11. Untuk menghilangkan sisa chromogen sediaan dicuci kembali dengan larutan PBS 2 kali @ 5 menit
12. Selanjutnya sediaan ditetesi dengan Mayer's hemotaksilin untuk memberi warna pada bagian-bagian sel lainnya selama 5 menit dan dicuci dengan air / air mengalir 5 menit
13. Setelah sediaan kering / diangin-anginkan, selanjutnya sediaan siap untuk ditutup dengan cover gelas, setelah terlebih dahulu ditetesi dengan entelan.

Penjelasan:

Antibodi primer merupakan antibodi yang langsung terikat pada penanda (marker) atau reseptor di membran sel, sedangkan Ab sekunder yang telah diberi biotin tujuan untuk mengikat zat warna (DAB chromogen) yang akan terikat pada streptavidin (Dako corporation brosur, 1997).

B. Penilaian hasil pewarnaan

Untuk mengetahui perubahan respon imun sel imunokompeten di daerah PARAKORTEKS kelenjar getah bening, dengan melihat perubahan warna sel-sel yang tadinya tidak coklat berubah menjadi warna coklat. Untuk menghemat biaya semua monoklonal antibodi yang dipergunakan menggunakan zat pewarna coklat. Aktivitas metabolisme yang meningkat karena pemberian fraksi metanol *Centella asiatica* dan fraksi terstandar ekstrak *Centella asiatica* pada tikus akan meningkatkan jumlah sel-sel limfosit-T (CD4+), limfosit-T (CD8+) serta sekresi imunoglobulin permukaan G (sIgG), imunoglobulin permukaan A (sIgA) maupun imunoglobulin permukaan M (sIgM).

LAMPIRAN 16 TEKNIK PEMBACAAN

Pembacaan sediaan objek gelas yang telah diwarnai dengan pewarna imunositokimia dibawah supervisi Dr dr Soegeng Sukamto M MS dan dibantu oleh Dr dr Watadianto MS sebagai berikut:

1. Sediaan objek gelas dibaca paling sedikit oleh 2 orang. Kedua hasil pengamatan tidak boleh berbeda. Ada atau tidaknya perbedaan pengamatan 2 pengamat dapat dibuktikan dengan menggunakan uji statistik keajegan. Kalau sediaan objek gelas dibaca oleh 3 orang, maka hasil bacaan disebut sama, bila 2 dari 3 orang pengamat menunjukkan hasil yang sama setelah diuji dengan uji statistik keajegan. Jika hasil bacaan dari 2 pengamat berbeda maka perlu dilakukan pembacaan ulang. Jika hasil bacaan kedua pengamat, tidak ada perbedaan menurut batas-batas yang masih diizinkan uji statistik atau memberi hasil sama maka untuk analisis selanjutnya dipergunakan hasil pengamatan peneliti.
 2. Pengamatan sel yang telah menyerap warna dibatasi oleh mikrometer atau gratikulae yang berukuran 0.5 X 0,5 mm. Dibuat perjanjian sebagai berikut: untuk menetapkan sel yang mana yang dapat dimasukkan sebagai data pengamatan.
 - Pertama sel-sel yang berpotongan dengan garis pinggir atas dan garis pinggir samping kiri diikutkan dalam perhitungan;
 - Kedua sel-sel yang mengalami perpotongan dengan garis pinggir kanan dan bawah tidak diikutkan dalam perhitungan;
 - Ketiga berdasarkan pewarnaan sel-sel yang diikutkan dalam perhitungan adalah sel-sel yang sitoplasmanya menyerap zat warna, yaitu a) sel-sel yang menyerap zat warna pada pinggir membran sel; b) keseluruhan sel menyerap zat warna, sehingga bentuk zat warna sesuai dengan bentuk sel; c) hanya sebagian zat warna menempel pada sel; d) jika terdapat keraguan, maka sel-sel tersebut tidak diperhitungkan atau *drop out*.
 3. Pembacaan memakai mikroskop cahaya, Nikon S- KT 7- 123387, 110 volt dilengkapi dengan lensa okuler 10 X dan lensa objektif 5, 10, 40 dan 100 dari Laboratorium histologi FK Unair dengan nomor registrasi PDK / PT.03-02.221.1800/ 579/NK/78/P4T. dilengkapi dengan mikrometer atau gratikulae ukuran 0,5 X 0,5 mm.
 4. Mikroskop cahaya untuk pengambilan gambar sel setelah pewarnaan merek Nikon dengan pembesaran 10X lensa okuler dan 5,10, 40, 100 dan 125 untuk lensa objektif di Lab. Pat. Anatomi RSUD Dr Sutomo.
-