

## TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK UMBI BAWANG PUTIH  
(*ALLIUM SATIVUM* LINN.) TERHADAP JUMLAH MAKROFAG  
PENGEKSPRESI NF $\kappa$ B, SEL PENGHASIL INTERFERON  $\gamma$ ,  
DAN LIMFOSIT PENGHASIL INTERLEUKIN 2 PADA MENCIT  
BALB/c**



kk  
kk. A  
TKD.02/11  
Sun  
P



**Titiek Sunaryati**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2010**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK UMBI BAWANG PUTIH  
(*ALLIUM SATIVUM* LINN.) TERHADAP JUMLAH MAKROFAG  
PENGEKSPRESI NF $\kappa$ B, SEL PENGHASIL INTERFERON  $\gamma$ ,  
DAN LIMFOSIT PENGHASIL INTERLEUKIN 2 PADA MENCIT  
BALB/c**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Kedokteran Dasar  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**Titiek Sunaryati  
NIM. 090810170 M**

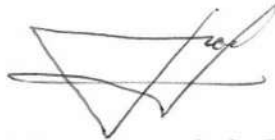
**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2010**

**Lembar pengesahan**

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 16 Juli 2010

Oleh

Pembimbing Ketua



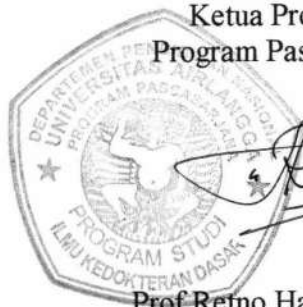
dr. Troef Soemarno, MS, Sp.PA (K)  
NIP.194902111978021001

Pembimbing II



Dr. I Ketut Sudiana, MS  
NIP.195507051980031005

Mengetahui  
Ketua Program Studi IKD  
Program Pascasarjana FK Unair



Prof. Retno Handajani, dr, MS, PhD  
NIP.194810121976032001

Telah diuji pada  
Tanggal 16 Juli 2010  
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Paulus Liben, dr., MS  
Anggota : 1. Prof. Dr. H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK  
2. dr. Troef Soemarno, MS, Sp.PA (K)  
3. Dr.I Ketut Suidiana, MS  
4. dr.Tulus Panuwun, MS, Sp.PA (K)  
5.Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada dr. Troef Soemarno, MS, Sp.PA (K), Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. I Ketut Suidiana, MS, Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Prof. Dr. Fasichul Lisan Apt, selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya; Prof. Dr. Muhammad Amin dr, Sp.P(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya; Prof. Dr. Harjanto JM dr, AIF, selaku Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya; Prof. Retno Handajani dr, MS, PhD, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar (IKD) Fakultas Kedokteran Unair Surabaya; dr. Troef Soemarno, MS, Sp.PA(K), selaku Ketua Minat Studi Patobiologi Fakultas Kedokteran Unair Surabaya.

Dr. Hari Basuki, dr. M.Kes, atas kesediaan beliau menjadi konsultan Biostatistika yang memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.

Prof. Dr. Paulus Liben, dr., MS selaku ketua panitia penguji tesis; Prof. Dr. H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK dan dr.Tulus Panuwun, MS, Sp.PA (K) atas kesediaan beliau menjadi panitia penguji tesis.

Teman-teman seangkatan Ilmu Kedokteran Dasar Minat Studi Patobiologi (Nenny Prasetyaningrum, drg, Nindya Shinta, dr, Luh Ade Wilan, Ssi, Wahyudi Widada, S.Kep.Ns.) yang telah menjadi sahabat selama menempuh pendidikan.

Bapak Iwan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi UNAIR, yang telah banyak membantu saya pada saat pembuatan ekstrak bawang putih.

Bapak Heri di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNAIR, yang telah banyak membantu saya pada saat melakukan perlakuan terhadap hewan coba.

Bapak Eko dan bapak Barry di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo, yang telah membantu saya dalam pembuatan sediaan blok paraffin.

Mbak Leny, Amd di Laboratorium Patobiologi-Gramik Fakultas Kedokteran UNAIR, yang telah membantu pengerjaan pewarnaan imunohistokimia.

Kepada orang tua saya tercinta yang telah membesarkan dan mendidik saya serta selalu memberikan dorongan dan dukungan kepada saya agar terus maju dalam segala hal-hal yang baik. Terima kasih untuk semua doanya sehingga saya dapat menyelesaikan S2 saya dengan baik.

Kepada suami tercinta, Tedja Widartha, Drs.Ec, yang dengan kesabarannya selalu mendorong dan mendukung saya untuk tetap menyelesaikan pendidikan S2 ini. Terima kasih telah menjadi teman diskusi dan berbagi beban saat-saat saya mengalami kesulitan. Kebersamaan kita selalu menguatkan saya.

Kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, namun tanpa bantuan mereka, penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.

Akhir kata, ijinkanlah saya menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas segala sesuatu yang kurang berkenan selama saya menempuh pendidikan ini. Semoga Allah Yang Maha Kasih memberkati kita semua. Amin.

Surabaya, Juli 2010

## RINGKASAN

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Umbi Bawang Putih (*Allium Sativum* Linn.) Terhadap Jumlah Makrofag Pengekspresi NFκB, Sel Penghasil Interferon γ, dan Limfosit Penghasil Interleukin 2 Pada Mencit BALB/c**

*Common cold* adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus. Gejala dapat timbul karena menurunnya daya tahan tubuh. Pengobatan yang digunakan pada umumnya ialah *antihistamine*, *decongestan*, *antipiretik*, dan *ekspektoran*. Obat lain yang dapat kita gunakan ialah *immunomodulator*.

Sampai sekarang mekanisme meningkatnya imunitas tubuh karena pemberian ekstrak bawang putih belum dapat dijelaskan.

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak bawang putih terhadap jumlah makrofag pengekspresi NFκB, jumlah sel penghasil interferon γ, dan jumlah limfosit penghasil interleukin 2 pada mencit BALB/c jantan.

Penelitian ini bersifat eksperimental murni, dengan menggunakan mencit BALB/c jantan (*mus musculus*) sebagai hewan coba. Kami menggunakan 27 ekor mencit yang dibagi dalam 3 kelompok, masing-masing terdiri dari 9 ekor. Kelompok 1 (K) diberi placebo (CMC Na<sup>+</sup>) selama 14 hari, kelompok 2 (P1) mendapat ekstrak bawang putih 10 mg/kg BB selama 14 hari, dan kelompok 3 (P2) mendapat ekstrak bawang putih 20 mg/kg BB selama 14 hari. Setelah 14 hari mencit dikorbankan dan diambil usus halus untuk diproses menjadi parafin blok. Pengecatan dilakukan menggunakan metode imunohistokimia.

Hasil analisis jumlah makrofag pengekspresi NFκB menunjukkan nilai rerata±SD kelompok K ialah (4,44±1,42)%, kelompok P1 ialah (43,22±3,31)%, kelompok P2 ialah (76,89±2,89)%. Hasil analisis jumlah sel penghasil interferon γ menunjukkan nilai rerata±SD kelompok K ialah (4,00±0,87)%, kelompok P1 ialah (33,89±3,98)%, kelompok P2 ialah (63,89±3,59)%. Hasil analisis jumlah limfosit penghasil *interleukin 2* menunjukkan nilai rerata±SD kelompok K ialah (4,22±1,09)%, kelompok P1 ialah (29,00±3,97)%, kelompok P2 ialah (47,78±3,19)%.

Data jumlah makrofag pengekspresi NFκB menunjukkan adanya perbedaan pada ketiga kelompok setelah dianalisa menggunakan uji Brown-Forsythe. Selanjutnya perbedaan yang ada dianalisa dengan Games Howell ( $p < 0,05$ ) dan didapatkan bermakna. Uji Brown-Forsythe menunjukkan adanya perbedaan yang juga bermakna di ketiga kelompok mencit pada variabel jumlah sel penghasil interferon γ dan jumlah limfosit penghasil *interleukin 2*.

Berdasarkan penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak bawang putih pada mencit BALB/c jantan dapat meningkatkan jumlah makrofag

pengekspresi NF $\kappa$ B, jumlah sel penghasil interferon  $\gamma$ , dan jumlah limfosit penghasil *interleukin 2*. Ekstrak bawang putih dapat meningkatkan imunitas tubuh melalui peningkatan jumlah makrofag pengekspresi NF $\kappa$ B, sel penghasil interferon  $\gamma$ , dan limfosit penghasil *interleukin 2*.



## SUMMARY

### **Effect of Garlic Extract on The Amount of Macrophage that Express NF $\kappa$ B, The Amount of Cell that Produce Interferon $\gamma$ , and The Amount of Lymphocyte that Produce Interleukin 2 in BALB/c Mice**

Common cold is a contagious disease that is caused by viruses. The symptoms will appear when body immunity is decrease. Commonly we use antihistamine, decongestan, antipiretik, and ekspektorant. Another medicine that we can use is immunomodulator.

Garlic extract can increase body immunity but until now we do not known the mechanism.

The objective of this study was to prove the effect of garlic extract on the number of macrofag that express NF $\kappa$ B, the number of cell that produce interferon  $\gamma$ , and the number of limphocyte that produce interleukin 2 in white male BALB/c mice.

This was an experimental study using white male BALB/c mice (*mus musculus*) as pure experimental animal. These animal were divided into three groups, each comprised 9 mice. Group 1 (K) was not given garlic extract but was given placebo (CMC Na) for 14 days, group 2 (P1) received 10mg/kg BW garlic extract for 14 days, and group 3 (P2) received 20mg/kg BW garlic extract for 14 days. After 14 days mice were sacrificed then the intestines were removed and processed in the paraffin block, then were stained with immunohistochemistry. Data were analyzed by analysis of variance Brown Forsythe (because data had normal distribution but had not homogeny), any significant different was further analyzed by using Games Howell in the significant level of 0.05.

The result on the amount of macrophage that express NF $\kappa$ B showed mean $\pm$ SD group K was (4,44 $\pm$ 1,42)%, group P1 was (43,22 $\pm$ 3,31)%, group P2 was (76,89 $\pm$ 2,89)%. The result on the amount of cell that produce interferon  $\gamma$  showed mean $\pm$ SD group K was (4,00 $\pm$ 0,87)%, group P1 was (33,89 $\pm$ 3,98)%, group P2 was (63,89 $\pm$ 3,59)%. The result on the amount of lymphocyte that produce interleukin 2 showed mean $\pm$ SD group K was (4,22 $\pm$ 1,09)%, group P1 was (29,00 $\pm$ 3,97)%, group P2 was (47,78 $\pm$ 3,19)%.

Data on the amount of macrophage that express NF $\kappa$ B had a difference between groups in the result of Brown-Forsythe test. The difference was significant after further analysis by using Games Howell ( $p < 0.05$ ). There was difference between groups on the amount of cell that produce interferon  $\gamma$  in the result of Brown-Forsythe test. It showed significant difference ( $p < 0.05$ ) among the groups. The result

of Brown-Forsythe analysis of quantity lymphocyte that produce interleukin 2 showed that there was significant difference among the groups ( $p < 0.05$ ).

The conclusion of this experiment was the amount of macrophage that express NF $\kappa$ B on the BALB/c mice who were given garlic extract more than in mice who were not given garlic extract. The effect of garlic extract on BALB/c mice can increase the amount of cell that produce interferon  $\gamma$  and the amount of lymphocyte that produce interleukin 2. Garlic extract can increase body immunity via the increase on the amount of macrophage that express NF $\kappa$ B, the amount of cell that produce , and the amount of lymphocyte that produce interleukin 2.

## ABSTRACT

### **Effect of Garlic Extract on The Amount of Macrophage that Express NF $\kappa$ B, The Amount of Cell that Produce Interferon $\gamma$ , and The Amount of Lymphocyte that Produce Interleukin 2 in BALB/c mice**

Common cold is an infectious disease that is caused by viruses. More than 200 hundreds viruses can cause this disease. Many people in this world have this disease.

The purpose of this study is to explain how garlic extract can increase body immunity.

This was experimental study using white male BALB/c strain mice, 10 weeks old with bodyweight of 25-35 grams. Group 1 received placebo (CMC Na) for 14 days. Group 2 received 10mg/kg BW garlic extract for 14 days, and group 3 received 20mg/kg BW garlic extract for 14 days. After 14 days mice were sacrificed then intestines were removed and processed in the paraffin block, then were stained with immunohistochemistry.

There were three variables such as the amount of macrophage that expres NF $\kappa$ B, the amount of cell that produce interferon  $\gamma$ , and the amount of lymphocyte that produce interleukin 2. Data were analyzed by analysis of variance Brown Forsythe, any significant different was further analyzed by using Games Howell in the significant level of 0.05. There were significant difference between groups those received placebo, 10mg/kgBw garlic extract, and 20mg/kgBw garlic extract in each variables.

The conclusion of this experiment was garlic extract can increase body immunity via increase in the amount of macrophage that express NF $\kappa$ B, the amount of cell that produce interferon  $\gamma$ , and the amount of lymphocyte that produce interleukin 2.

Keywords: common cold, garlic extract, NF $\kappa$ B, interferon  $\gamma$ , and interleukin 2



## DAFTAR ISI

Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan terima kasih.....	vi
Ringkasan.....	viii
Summary.....	x
Abstrak.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Common Cold.....	6
2.2 Bawang Putih.....	7
2.3 Komposisi Umbi Bawang Putih.....	8
2.4 Makrofag.....	9
2.5 Jalur Sinyal Terkait NFκB.....	10
2.6 Interferon Gamma.....	12
2.7 Sel NK.....	13
2.8 Interleukin 12.....	14
2.9 Interleukin 2.....	14
2.10 T helper 1.....	15
2.11 Mencit BALB/c.....	15
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN... ..	17
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	17
3.2 Hipotesis Penelitian.....	19
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	20
4.1 Rancangan Penelitian.....	20
4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi.....	20
4.3 Variabel Penelitian.....	21
4.4 Bahan Penelitian.....	22
4.5 Instrumen Penelitian.....	24
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	24
4.7 Prosedur Penelitian.....	25

4.8	Tehnik Analisis Data.....	26
4.9	Etik Penelitian.....	26
4.10	Operasional Penelitian.....	27
<b>BAB 5</b>	<b>ANALISIS HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>28</b>
5.1	Data Penelitian.....	28
5.2	Analisis dan Hasil Penelitian.....	28
5.2.1	Jumlah makrofag pengeksresi NFκB.....	28
5.2.2	Jumlah sel penghasil IFN γ.....	30
5.2.3	Jumlah limfosit penghasil IL-2.....	32
5.2.4	Hasil pewarnaan imunohistokimia.....	34
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN.....</b>	<b>39</b>
<b>BAB 7</b>	<b>PENUTUP.....</b>	<b>47</b>
7.1	Kesimpulan.....	47
7.2	Saran.....	48
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>49</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>52</b>

## DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.1 : Kandungan <i>Allium sativum</i> Linn.....	9
Tabel 5.1 : Hasil analisis jumlah makrofag pengekspresi NFκB.....	29
Tabel 5.2 : Hasil analisis jumlah sel penghasil IFNγ.....	31
Tabel 5.3 : Hasil analisis jumlah limfosit penghasil IL-2.....	33

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1: Jalur sinyal terkait NFκB.....	12
Gambar 3.1: Kerangka konseptual penelitian.....	17
Gambar 4.1: Operasional penelitian.....	27
Gambar 5.1: Nilai rerata jumlah makrofag pengeksresi NFκB.....	30
Gambar 5.2: Nilai rerata jumlah sel penghasil interferon γ.....	32
Gambar 5.3: Nilai rerata jumlah limfosit penghasil <i>interleukin 2</i> .....	34
Gambar 5.4: Mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal NFκB pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. Tampak makrofag yang positif dengan sitoplasma berwarna coklat. (Perbesaran 400x).....	35
Gambar 5.5: Mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal IFNγ pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. Tampak makrofag dan limfosit yang positif dengan sitoplasma berwarna coklat. (Perbesaran 400x).....	36
Gambar 5.6: Mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal IL-2 pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. Tampak limfosit yang positif dengan sitoplasma berwarna coklat. (Perbesaran 400x).....	37
Gambar 5.7: Mukosa usus halus dengan pewarnaan haematoxylin eosin pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. (Perbesaran 400x).....	38

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Keterangan kelaikan etik.....	52
Lampiran 2 Cara membuat ekstrak bawang putih.....	53
Lampiran 3 Cara menghitung dosis larutan ekstrak bawang putih untuk mencit	54
Lampiran 4 Prosedur pemeriksaan imunohistokimia.....	55
Lampiran 5 Teknik pemrosesan jaringan dengan teknik rutin dan teknik Pengecatan haematoksilin eosin.....	56
Lampiran 6 Data jumlah makrofag pengeksresi NFκB.....	58
Lampiran 7 Data jumlah sel penghasil interferon γ.....	60
Lampiran 8 Data jumlah limfosit penghasil interleukin 2.....	62
Lampiran 9 Perhitungan statistik.....	64



## DAFTAR SINGKATAN

APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CMC	: <i>Carboxy Methyl Cellulose</i>
CTL	: <i>Cytotoxic Lymphocyte</i>
ICAM-1	: <i>Inter-cellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN $\gamma$	: <i>Interferon Gamma</i>
IK $\kappa$ B	: <i>Inhibitor Kinase <math>\kappa</math> Beta</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
ISPA	: <i>Infeksi Saluran Pernapasan Atas</i>
I $\kappa$ B	: <i>Inhibitor <math>\kappa</math> Beta</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NF $\kappa$ B	: <i>Nuklear Factor <math>\kappa</math> Beta</i>
RIP	: <i>Ribosome Inhibiting Protein</i>
Sel NK	: <i>sel Natural Killer</i>
TAK1	: <i>Transforming Growth Factor-beta Activated Kinase 1</i>
TCGF	: <i>T Cell Growth Factor</i>
Th	: <i>T helper</i>
TRADD	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor type1-Associated Death Domain</i>
TRAF2	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2</i>

# **BAB 1 PENDAHULUAN**



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

*Common cold* merupakan penyakit virus yang paling sering ditemukan pada manusia. Penyakit ini sangat menular dan gejala dapat timbul karena menurunnya daya tahan tubuh. Di Indonesia, Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) selalu menempati urutan pertama penyebab kematian pada kelompok bayi dan balita. ISPA juga sering berada pada daftar 10 penyakit terbanyak di rumah sakit. Survei mortalitas yang dilakukan oleh Subdit ISPA tahun 2005 menempatkan ISPA sebagai penyebab kematian bayi terbesar di Indonesia dengan persentase 22,30% dari seluruh kematian balita. Anak usia pra-sekolah dan sekolah dasar rerata mendapat serangan tiga sampai 12 kali pertahun sedangkan remaja dan dewasa muda dua sampai empat kali pertahun (Steven, 2009). Kenyataan membuktikan *common cold* adalah infeksi virus yang terbanyak di dunia, dimana terdapat lebih dari 200 jenis virus yang dapat mengakibatkan *common cold* (Boies, 1994). Bawang putih tidak hanya mencegah *common cold*, tetapi juga dapat memperpendek gejala dan derajat keparahannya (Marta, et al, 2007).

Pada umumnya terapi *common cold* yang digunakan ialah *antihistamin*, *dekongestan*, *antipiretik*, dan *ekspektoran*. Antibiotik digunakan bila terjadi infeksi sekunder (Boies, 1994). Teknik lain yang perlu diberikan ialah dengan meningkatkan imunitas tubuh menggunakan obat *immunomodulator*, salah satunya ialah bawang

putih (*Allium sativum* Linn.) (Marta, et al, 2007). Bawang putih adalah tanaman yang kaya senyawa organosulfur, bahan ini dapat meningkatkan imunitas tubuh (Eikai, 2001). Namun sampai sejauh ini mekanisme meningkatnya imunitas tubuh akibat pemberian ekstrak bawang putih belum dapat dijelaskan.

Infeksi virus terjadi oleh karena penurunan imunitas tubuh, bila imunitas tubuh tidak dipertahankan maka dapat terjadi infeksi sekunder dan komplikasi sehingga menyebabkan insiden penyakit dan biaya pengobatan meningkat. Komplikasi yang timbul juga akan mempersulit pengobatan sedangkan bawang putih mudah didapatkan dan juga murah harganya. Krisis ekonomi sudah melanda berbagai belahan dunia di jaman sekarang ini sehingga, masyarakat cenderung memilih pengobatan tradisional yang harganya lebih terjangkau serta memiliki efektivitas yang cukup baik. Kondisi geografis di Indonesia yang terdiri dari kepulauan menyebabkan pendistribusian obat-obatan farmasi jadi tidak merata, oleh karena adanya daerah yang sulit dijangkau dengan transportasi. Keberadaan obat seperti bawang putih sebagai salah satu bentuk tanaman obat keluarga yang mudah didapat sangat dibutuhkan (Eikai, 2001).

Bawang putih setelah diekstraksi akan menghasilkan zat yang bersifat stabil yaitu *S-allylcysteine*. Zat ini akan berikatan dengan reseptor yang ada di permukaan sel makrofag. Kompleks ini akan mengambil molekul yang berisi *tumor necrosis factor receptor associated death domain* (TRADD) yang akan berinteraksi dengan *Serine-Threonine kinase ribosome inhibiting protein* (RIP) dan *tumor necrosis factor receptor associated factor 2* (TRAF2). Keduanya mengaktifkan *transforming growth*

*factor beta activated kinase 1* (TAK1). TAK1 yang aktif berperan terhadap fosforilasi *inhibitor kinase kappa beta* (IK $\kappa$ B). IK $\kappa$ B menyebabkan degradasi *inhibitor kappa beta* (I $\kappa$ B). Hambatan pada I $\kappa$ B akan mengaktifkan *nuclear factor kappa beta* (NF $\kappa$ B) sehingga terjadilah translokasi NF $\kappa$ B aktif ke inti sel (George, 2002). Di inti NF $\kappa$ B menstimuli proses transkripsi yang menghasilkan interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) dan *interleukin 12* (IL-12) (Neil, 1997). IFN $\gamma$  akan merangsang aktifitas sitotoksik limfosit (CTL) dan sel *natural killer* (sel NK), disamping itu IL-12 bersamaan juga merangsang aktifitas limfosit *T helper 1* (Th1) dan *T helper 2* (Th2). Th1 menghasilkan IL-2 dan IFN $\gamma$ . IFN $\gamma$  selanjutnya merangsang aktifitas sel NK untuk membunuh virus atau sel yang terinfeksi virus dan membuat blokade reseptor pada sel tetangga sehingga sel tetangga kebal terhadap infeksi virus (Anthony, 2003).

Penelitian ini belum bisa dilaksanakan pada manusia, karena alasan etik tidak mungkin melaksanakan biopsi, maka digunakan hewan coba mencit strain BALB/c jantan sebagai model.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah jumlah makrofag pengekspresi NF $\kappa$ B pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih?
2. Apakah jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih?

3. Apakah jumlah limfosit penghasil IL-2 pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan umum**

Menjelaskan mekanisme meningkatnya imunitas tubuh akibat pemberian ekstrak bawang putih.

#### **1.3.2 Tujuan khusus**

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang putih secara oral terhadap jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang putih secara oral terhadap jumlah sel penghasil interferon  $\gamma$ .
3. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang putih secara oral terhadap jumlah limfosit penghasil IL-2.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat teoritis**

Memberi informasi ilmiah tentang mekanisme meningkatnya imunitas tubuh akibat pemberian ekstrak bawang putih secara oral pada mencit.

### **1.4.2 Manfaat praktis**

Sebagai dasar pengembangan obat tradisional yang mudah didapat.

## **BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Common Cold*

*Common cold* (flu) ialah peradangan kataralis karena virus pada mukosa hidung yang sering menjalar ke tenggorokan (nasofaring, tonsil dan laring), sehingga dijumpai gejala faringitis akut, tonsillitis akut, dan laringitis akut. *Common cold* lebih merupakan kompleks gejala daripada penyakit. Penyakit ini mudah ditemukan dalam kehidupan sehari-hari bila terjadi penurunan daya tahan tubuh (Boies, 1994).

Virus *common cold* (flu) ditularkan melalui kontak dengan *saliva* atau sekret hidung melalui udara yang terkontaminasi oleh penderita yang batuk atau bersin. Pintu masuk virus biasanya melalui hidung atau mata, kemudian virus menuju bagian belakang hidung dan daerah adenoid. Virus berikatan dengan reseptor *inter-cellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) pada permukaan sel di perbatasan nasofaring. Sejumlah besar reseptor virus ada di permukaan sel adenoid, setelah berikatan dengan reseptor, virus langsung masuk ke dalam sel dan terjadilah proses infeksi. *Rhinovirus* secara umum tidak merusak epitel hidung. Makrofag memicu produksi sitokin yang menyebabkan gejala sistemik. Bradikinin memainkan peran penting dalam menyebabkan gejala seperti sakit tenggorokan dan iritasi hidung (Eccles, 2005).

*Common cold* adalah *self-limiting disease* dan sistem imun *host* adalah hal yang sangat menentukan pada penyakit ini. Respon imun humoral mulai menghasilkan antibodi spesifik dalam beberapa hari untuk mencegah virus menginfeksi sel.

Leukosit tersebut juga membunuh virus melalui proses fagositosis dan membunuh sel yang terinfeksi untuk mencegah replikasi virus. Pada pasien dengan imunitas tubuh yang baik dapat sembuh sendiri dalam tujuh hari (Eccles, 2005).

## 2.2 Bawang Putih (*Allium sativum* Linn.)

Bawang putih (*Allium sativum* Linn.) sudah lama dikenal sebagai tanaman obat tradisional dan bumbu dapur, dan akhir-akhir ini ditemukan atau dibuktikan khasiatnya secara medis teknis. Tidak dapat dipastikan sejak kapan manusia menggunakan bawang putih dalam makanannya, akan tetapi dapat dikatakan bahwa bawang putih sebagai bumbu dapur sudah dikenal sejak manusia mulai mengolah makanannya. Beberapa catatan yang berasal dari jaman dahulu, diketahui bahwa selain sebagai bumbu dapur, bawang putih juga dipergunakan sebagai obat. Bawang putih, dalam ilmu pengobatan tradisional dapat dipakai untuk mengurangi atau menyembuhkan berbagai macam gangguan penyakit (Liang, 1991).

Purseglove (1985) berpendapat bahwa secara taksonomi bawang putih diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Kelas	: <i>Monocotyledoneae</i>
Bangsa	: <i>Liliiflorae</i>
Suku	: <i>Liliceae</i>
Marga	: <i>Allium</i>
Jenis	: <i>Allium sativum</i> Linn.

### 2.3 Komposisi Umbi Bawang Putih

Tanaman *Allium sativum* Linn. telah banyak dibudidayakan di berbagai negara untuk kepentingan pengobatan. Bawang putih mempunyai peran penting sebagai anti-mikroba, anti-trombosis, anti-atherosklerotik, anti-hiperglikemik, anti-inflamasi, anti-hipertensi, dan anti-karsinogen (Kang, 2001).

Bawang putih mengandung 0,24% *S-allylcysteine S-oxide* (*alliin*) dan enzim *allinase* atau *alliinlyase*, yang mengubah *alliin* menjadi *allicin*. Pada pemanasan aktivitas *allinase* akan mengalami kerusakan sehingga *alliin* tidak menjadi *allicin*. Ketika bawang putih dipotong, diremas atau dipukul *alliin* segera berubah menjadi *allicin* (*thiosulphinates*). *Allicin* adalah senyawa yang memberikan bau khas bawang putih (Tzou-C.H, 2009).

Ekstrak bawang putih mengandung zat yang bersifat anti oksidan yang tidak stabil yaitu *allicin* dan juga zat yang stabil yaitu *S-allylcysteine* dan *S-allylmercaptocysteine*. Ketiga komponen ini merupakan senyawa organosulfur (Borek, 2001). *S-allylcysteine* adalah *immunomodulator* yang efisien melalui stimulasi aktivitas makrofag dan produksi sitokin oleh makrofag (Kang, 2001).

Analisis kandungan gizi 100 gram *Allium sativum* Linn. adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1 Kandungan *Allium sativum* Linn.

Air	61-68%
Kalori	122 kal
Protein ( <i>allicin, S-allylcysteine, S-allylmercaptocysteine</i> )	3,5-7%
Lemak	0,3%
Karbohidrat	24-28%
Serat	0,7%
Beta-karoten	sangat sedikit
Thiamin (vitamin B1)	sedikit
Riboflavin (vitamin B2)	sedikit
Niacin	sedikit
Asam askorbat (vitamin C)	sedikit
Calcium	28,00 mg
Kalium	377,00 mg
Natrium	16,00 mg
Zat besi	1,5 mg
Fosfor (sbg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	109,00 mg

(Sumber Atal, 1982)

## 2.4 Makrofag

Makrofag merupakan sistem fagositosis mononuklear yang ditemukan pada jaringan tubuh, yang berasal dari monosit dan masuk ke jaringan tubuh, disini dia akan proliferasi menghasilkan sel sejenis. Sel makrofag bentuknya tidak teratur, inti lonjong atau bentuk ginjal dengan letak eksentrik, mengandung granula *azurofilik*, berumur panjang dan dapat bertahan berbulan-bulan di dalam jaringan (Bevelander, 1988).

Fagositosis merupakan suatu proses untuk memakan bakteri atau benda asing, dimana setelah bakteri atau benda asing melekat pada permukaan makrofag maka

makrofag membentuk sitoplasma dan melekat ke dalam membungkus bakteri atau benda tersebut. Tonjolan sitoplasma yang saling bertemu itu akan melebur menjadi satu sehingga benda asing atau bakteri akan tertangkap didalam sebuah vakuol fagositik intrasel. Lisosom yang merupakan suatu sistem pencernaan intra sel dengan kemampuan memecah materi yang berasal dari luar maupun dari dalam. Lisosom akan menyatu dengan vakuola lalu memusnahkan bakteri atau benda asing tersebut (Bevelander, 1988).

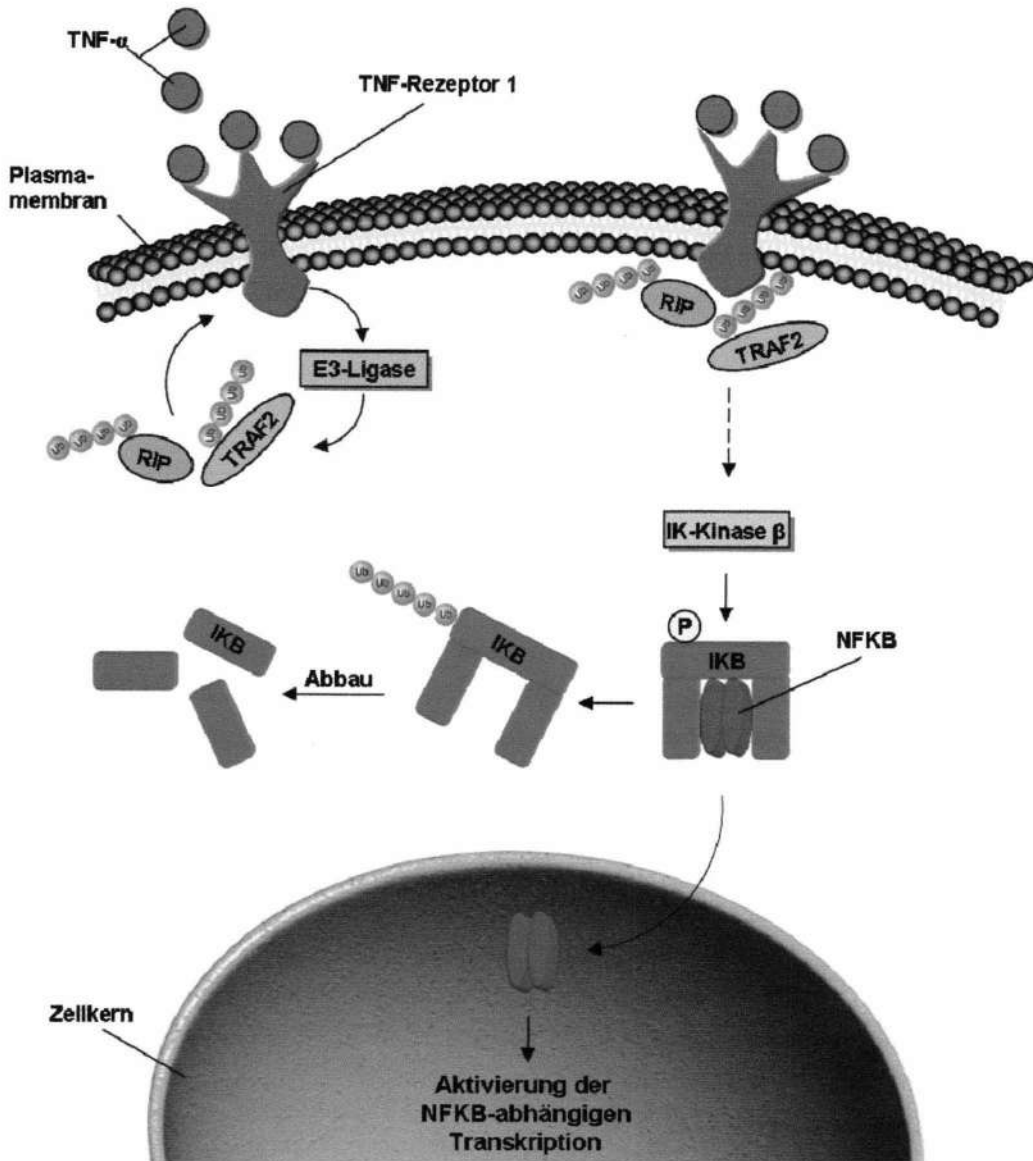
Makrofag mempunyai fungsi memakan partikel dan mencernanya yang dilakukan oleh lisosom, dalam sistem imun tubuh sel ini berperan serta dalam mempengaruhi aktivitas dari respon imun, mereka menelan, memproses dan menyimpan antigen serta menyampaikan informasi pada beberapa sel berdekatan secara imunologis kompeten (limfosit dan plasmatis). Makrofag yang aktif juga merupakan sel sekretori yang dapat mengeluarkan beberapa substansi penting, termasuk beberapa enzim, lisozim, elastase, kolagenase, dua protein dari sistem komplemen dan gen anti virus penting yaitu interferon (Bevelander, 1988).

## 2.5 Jalur Sinyal terkait NF $\kappa$ B

Faktor transkripsi *Nuklear Factor kappa Beta* (NF $\kappa$ B) diaktifkan oleh bermacam-macam stimuli. NF $\kappa$ B sering disebut sebagai mediator utama pada respon imun. Berbagai macam bakteri dan virus dapat memicu aktivasi NF $\kappa$ B, yang akan mengontrol ekspresi bermacam *cytokines*, *chemokines*, reseptor imun, dan beberapa molekul perlekatan pada permukaan sel. NF $\kappa$ B juga berperan sebagai regulator utama

pada respon stres, pada kondisi yang bermacam-macam, antara lain stres fisik, stres oksidatif, dan paparan bahan kimia tertentu juga dapat mengaktifkan NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B memegang peran penting pada proliferasi dan diferensiasi sel. Ada berbagai macam jalur sinyal yang tergantung pada NF $\kappa$ B. Pada sel yang tidak distimuli NF $\kappa$ B terletak di sitoplasma berikatan dengan protein *inhibitor kappa beta* (I $\kappa$ B) (Neil, 1997).

Protein asing dapat menstimuli makrofag. Protein berikatan dengan reseptor pada permukaan sel makrofag. Kompleks ini akan mengambil molekul yang berisi *tumor necrosis factor receptor associated death domain* (TRADD) yang akan berinteraksi dengan *Serine-Threonine kinase ribosome inhibiting protein* (RIP) dan *tumor necrosis factor receptor associated factor 2* (TRAF2). Keduanya mengaktifkan *transforming growth factor beta activated kinase 1* (TAK1). TAK1 yang aktif berperan terhadap fosforilasi *inhibitor kinase kappa beta* (IK $\kappa$ B). IK $\kappa$ B menyebabkan degradasi I $\kappa$ B. Hambatan pada I $\kappa$ B akan mengaktifkan *nuclear factor kappa beta* (NF $\kappa$ B) sehingga terjadilah translokasi NF $\kappa$ B aktif ke inti sel (George, 2002). Di inti NF $\kappa$ B menstimuli proses transkripsi yang menghasilkan interferon gamma (IFN $\gamma$ ) dan *interleukin 12* (IL-12) (Neil, 1997).



Gambar 2.1 Jalur sinyal terkait NFκB

## 2.6 Interferon Gamma (IFN $\gamma$ )

Interferon gamma adalah sitokin yang termasuk dalam kelompok interferon tipe II. Interferon tipe I stabil pada kondisi asam. Interferon ini disebut juga *macrophage activating factor* dan berperan pada *innate and adaptive immunity* terhadap virus,

bakteri intraseluler, dan pengontrol tumor. Dibandingkan dengan IFN $\alpha$  dan  $\beta$  yang dapat diekspresikan oleh semua sel, IFN $\gamma$  diproduksi oleh makrofag dan limfosit T *helper 1* (Th1) (Schoenborn, 2007).

Fungsi IFN $\gamma$  antara lain meningkatkan *antigen presenting cells* (APC) dari makrofag, meningkatkan dan mengaktifkan lisosom pada makrofag, menekan aktivitas sel T *helper 2*, menyebabkan sel normal dapat mengekspresi molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas I, meningkatkan perlekatan pada migrasi leukosit, meningkatkan aktivitas sel *natural killer* (sel NK), mengaktifkan *antigen presenting cells* dan menunjang diferensiasi Th1 (Schroder, 2004). IFN $\gamma$  juga membuat blokade reseptor pada sel tetangga sehingga sel tetangga kebal terhadap infeksi virus (Anthony, 2003).

## 2.7 Sel *Natural Killer* (sel NK)

Sel NK adalah limfosit yang besar dan bergranul serta bersifat sitotoksik yang merupakan komponen utama dari *innate immune system*. Sel NK berfungsi membunuh sel-sel tumor dan sel yang terinfeksi virus, yang dibunuh dengan melepaskan granulae sitoplasma kecil dari protein yang disebut *perforin* dan *granzyme* yang menyebabkan sel target mengalami apoptosis. *Perforin* akan melubangi membran sel dari sel target dimana *granzyme* dapat masuk melaluinya dan menginduksi apoptosis. Apoptosis berbeda dengan lisis, bila sel mengalami lisis maka virus yang ada di dalam sel akan keluar. Pada peristiwa apoptosis virus yang berada di dalam sel akan hancur (Anthony, 2003).



Sel NK diaktifkan oleh interferon gamma yaitu sitokin yang diproduksi oleh makrofag. Mereka membunuh virus lebih dahulu sebelum respon imun adaptif mulai bekerja (Abbas A.K, 1994). IFN $\gamma$  merangsang aktifitas sel NK dan CTL. Sel NK dan CTL yang aktif akan membunuh virus atau sel yang terinfeksi virus (Anthony, 2003).

### **2.8 Interleukin 12 (IL-12)**

IL-12 adalah sitokin yang dikode oleh dua gen terpisah yaitu IL-12A (p35) dan IL-12B (p40). IL-12 terlibat dalam diferensiasi limfosit T menjadi Th 1 atau Th 2. IL-12 disebut juga *T cell stimulating factor*, yang dapat menstimuli pertumbuhan dan fungsi limfosit T. IL-12 juga menstimuli produksi IFN $\gamma$  dan *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) dari limfosit T dan sel NK (Abbas, 1994).

IL-12 memainkan peran penting dalam aktivitas sel NK dan limfosit T. Dia dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik dari sel NK dan Cluster of Differentiation (CD)8+*cytotoxic T lymphocytes* (CTL). Ada hubungan antara IL-2 dan transduksi sinyal IL-12 terhadap sel NK. IL-2 merangsang ekspresi dua reseptor pada IL-12 yaitu IL-12R- $\beta$ 1 dan IL-12R- $\beta$ 2 (Abbas, 1994).

### **2.9 Interleukin 2 (IL-2)**

*Interleukin 2* disebut juga *T cell growth factor* (TCGF) adalah sitokin yang bertanggung jawab dalam proliferasi limfosit T. IL-2 adalah molekul interleukin pertama yang ditemukan. IL-2 termasuk *autocrine growth factor* sebab diproduksi oleh sel T dan berperan dalam proliferasi sel T (Abbas, 1994).

Fungsi dari IL-2 adalah komponen utama *autocrine growth factor* untuk limfosit T. IL-2 disintesis oleh sel T yang teraktivasi. IL-2 juga merangsang pertumbuhan sel NK, meningkatkan fungsi sitolitik, berperan pada sel B sebagai faktor pertumbuhan dan merangsang stimulus antibodi (Abbas, 1994).

### **2.10 T helper 1 (Th 1)**

Sel T adalah bagian dari limfosit yang termasuk salah satu sistem imunitas tubuh. Mereka tidak mempunyai aktivitas sitotoksik dan fagositik, tanpa kehadiran sel-sel imun yang lain maka sel T dapat dianggap tidak berguna. Sel T berperan meningkatkan aktivitas fagositosis sel-sel imun yang lain, oleh karena itu disebut *T helper* (Abbas, 1994).

Sel Th0 akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2. Sel Th1 yang terbentuk dapat memproduksi sitokin yang disebut IFN $\gamma$ , IFN $\gamma$  ini bertugas meningkatkan aktivitas sel NK untuk memfagosit sel virus atau sel yang mengandung virus. Sel Th1 juga dapat memproduksi sitokin yang disebut IL-2 (Abbas, 1994).

### **2.11 Mencit BALB/c**

Mencit termasuk dalam genus *Mus*, subfamily *Murinae*, family *Muridae*, order *Rodentia*. Mencit yang sering dipakai untuk penelitian biomedis adalah *Mus musculus*. Pada umur empat minggu berat badannya mencapai 18-20 gram. Jantung terdiri dari empat ruang dengan dinding atrium yang tipis dan dinding ventrikel yang lebih tebal. Peningkatan temperatur tubuh tidak mempengaruhi tekanan darah,

sedangkan frekuensi jantung, *cardiac output* berkaitan dengan ukuran tubuhnya (Diah, 2004).

Tiga pasang kelenjar saliva yakni submaksilaris (submandibularis), parotid dan sublingualis yang terdapat di bagian ventral daerah leher terdapat pada mencit. Lambung mencit seperti pada tikus, terbagi dalam glandular dan non glandular. Lambung mencit mempunyai kapasitas 0,4cc, tractus urinaria terdiri dari ginjal, ureter, vesica urinaria dan urethra. Urine yang dikeluarkan setiap kali hanya satu atau dua tetes tetapi konsentrasinya sangat tinggi (Diah, 2004).

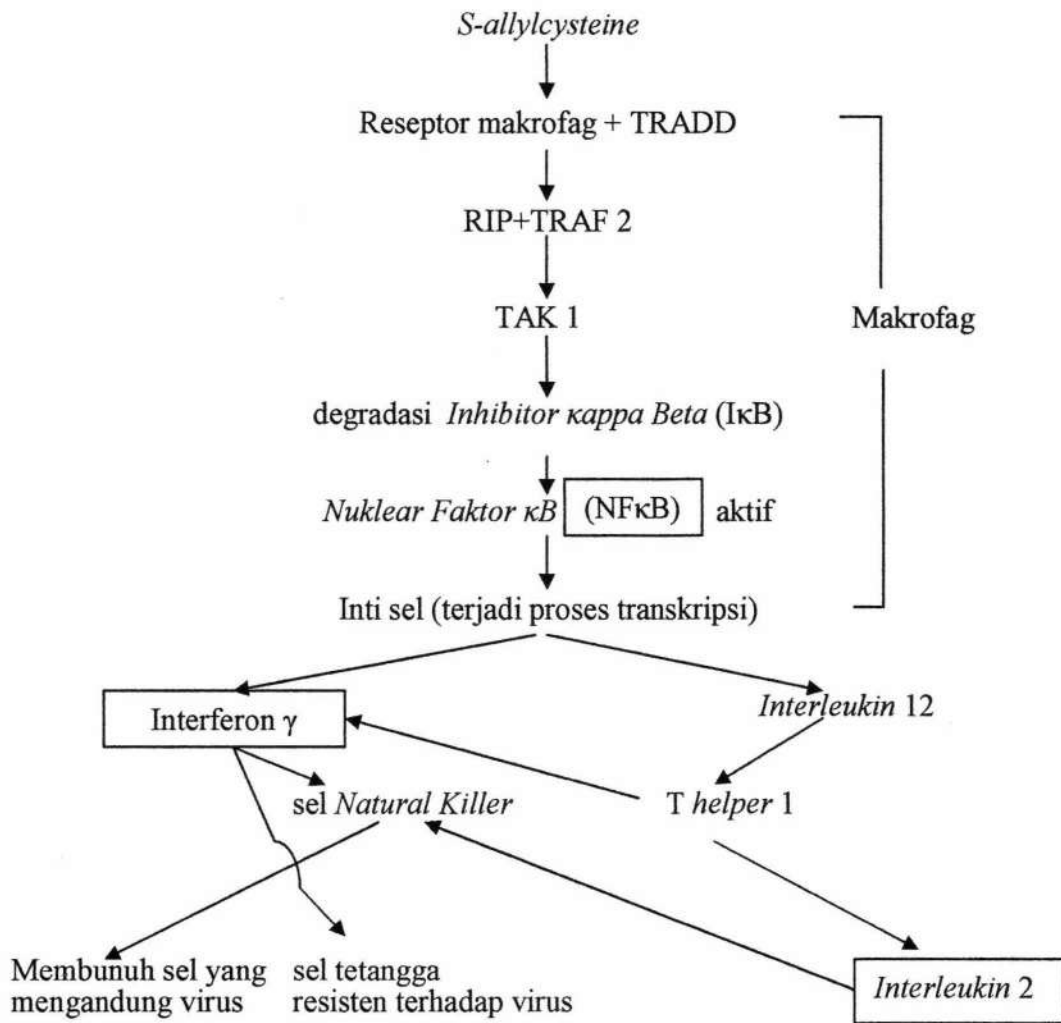
Adapun data biologi mencit ialah berat badan 25-35gram, lama hidup 1-3 tahun, temperatur tubuh 36,5°C, kebutuhan air *ad libitum*, kebutuhan makanan 4-5gr/hari, frekuensi respirasi 163 permenit, tekanan darah sistolik 133-160mmHg dan diastolik 102-110mmHg. Diantara species hewan lainnya, mencitlah yang paling banyak digunakan untuk tujuan penelitian medis (60-80%) karena murah harganya dan mudah berkembang biak (Diah, 2004).

**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL**  
**DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konseptual Penelitian**



Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan:

□ Diteliti

TRADD : Tumor Necrosis Factor Receptor type1-Associated Death Domain

TRAF2 : Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2

RIP : Ribosome Inhibiting Protein

TAK1 : Transforming Growth Factor-beta Activated Kinase 1

*Common cold* adalah suatu kompleks gejala dari suatu penyakit tertentu yang disebabkan oleh virus. Gejala *common cold* dapat timbul karena penurunan daya tahan tubuh sehingga memudahkan terjadinya infeksi virus.

Pada bawang putih (*Allium sativum* Linn.) terdapat kandungan *S-allylcysteine* yang berperan dalam menstimuli aktivitas makrofag sehingga menghasilkan interferon gamma (IFN $\gamma$ ) dan *interleukin 12* (IL-12).

*S-allylcysteine* akan berikatan dengan reseptor yang ada di permukaan sel makrofag. Kompleks ini akan mengambil molekul yang berisi TRADD yang akan berinteraksi dengan *Serine-Threonine kinase* RIP dan TRAF2. Keduanya mengaktifkan TAK1. TAK1 yang aktif berperan terhadap fosforilasi IK $\kappa$ B. IK $\kappa$ B menyebabkan degradasi I $\kappa$ B. Hambatan pada I $\kappa$ B akan mengaktifkan NF $\kappa$ B sehingga terjadilah translokasi NF $\kappa$ B aktif ke inti sel. Di inti NF $\kappa$ B menstimuli proses transkripsi yang menghasilkan IFN $\gamma$  dan IL-12.

IL-12 menstimuli aktivitas limfosit T *helper* 1 yang menghasilkan IFN $\gamma$  dan IL-2. IFN $\gamma$  menstimuli aktivitas sel NK yang berperan dalam membunuh virus atau sel yang mengandung virus. IFN $\gamma$  juga berperan dalam menyebabkan sel tetangga resisten terhadap virus. IL-2 berperan dalam merangsang pertumbuhan sel NK.

Pemberian bawang putih secara oral pada mencit BALB/c jantan dapat meningkatkan daya tahan tubuh.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih.
2. Jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih.
3. Jumlah limfosit penghasil IL-2 pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih.

## **BAB 4** **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

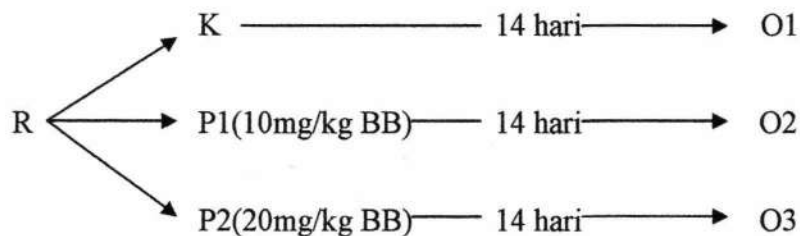


## BAB 4

### MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental murni, dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut:



#### Keterangan

- R : Randomisasi unit eksperimen  
 K : Kelompok kontrol, diberi CMC Na<sup>+</sup> 0,5% (placebo)  
 P1 : Kelompok perlakuan, diberi ekstrak bawang putih 10mg/kg BB  
 P2 : Kelompok perlakuan, diberi ekstrak bawang putih 20mg/kg BB  
 O : Observasi

#### 4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi

Unit eksperimen pada penelitian ini adalah mencit BALB/c jantan yang secara fisik tampak sehat berumur 10 minggu, berat badan 25-35 gram. Jumlah replikasi

minimal untuk pengujian hipotesis penelitian ditentukan berdasarkan rumus Federer (Federer, 1955):

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(3 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$r \geq 9$$

t = jumlah kelompok

r = jumlah replikasi

Jumlah replikasi minimal per kelompok adalah 9.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Klasifikasi variabel**

1. Variabel bebas: ekstrak bawang putih dosis 10mg/kgBB dan 20mg/kgBB.
2. Variabel tergantung: persentase jumlah makrofag pengeksresi NFκB, persentase jumlah sel penghasil IFNγ, dan persentase jumlah limfosit penghasil IL-2.
3. Variabel kendali antara lain umur mencit, jenis kelamin mencit, berat badan mencit, perawatan dan sanitasi kandang, makanan dan minuman mencit, waktu perlakuan, dan cara pemberian ekstrak bawang putih.

### 4.3.2 Definisi operasional variabel

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini dapat didefinisikan sebagai berikut:

1. Ekstrak bawang putih yang dibuat dari bawang putih dengan metode maserasi dengan dosis 10mg/kgBB dan 20mg/kgBB diberikan 1x/hari.
2. Persentase jumlah makrofag pengeksresi NFκB adalah persentase jumlah makrofag yang memberikan reaksi positif terhadap anti NFκB dibandingkan terhadap semua makrofag yang dihitung dengan menggunakan graticulae.
3. Persentase jumlah sel penghasil IFNγ adalah persentase jumlah sel (makrofag dan limfosit) yang memberikan reaksi positif terhadap anti IFNγ dibandingkan terhadap semua sel (makrofag dan limfosit) yang dihitung dengan menggunakan graticulae.
4. Persentase jumlah limfosit penghasil IL-2 adalah persentase jumlah limfosit yang memberikan reaksi positif terhadap anti IL-2 dibandingkan terhadap semua limfosit yang dihitung dengan menggunakan graticulae.

### 4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Hewan coba dengan kriteria jenis mencit (*Mus musculus*): BALB/c berjenis kelamin: jantan, berat badan :25-35 gram, umur mencit: 10 minggu, kesehatan

mencit dapat diamati dari gerakan cukup lincah, tidak lesu, kulit bersih dan tanpa luka, mata terang dan tidak sayu.

2. Jenis makanan pellet CP 511 dan jenis minuman aqua destilata.
3. Perawatan mencit pemberian makanan pellet 10 gr/ekor/hari, pemberian minum secara ad libitum 1 liter/3 hari untuk 10 ekor, penggantian sekam untuk alas tidur 2 hari sekali, untuk sanitasi kandang dibersihkan setiap hari dengan suhu sesuai dengan suhu ruang, ventilasi dan sinar matahari yang cukup, dan tidak lembab.
4. Pembuatan ekstrak bawang putih.

Umbi bawang putih dikupas kulit luarnya, dicuci bersih dan diiris tipis-tipis, kemudian diangin-anginkan hingga kering. Selanjutnya irisan bawang tersebut dibuat serbuk. Serbuk bawang putih kemudian dilarutkan dalam etanol 96% dengan metode maserasi ( bahan direndam etanol 1x24 jam hingga etanolnya menguap, lalu disaring untuk diambil filtratnya). Ampas bawang putih dimaserasi kembali selama 1x24 jam, kemudian diambil filtratnya. Pengambilan filtrat dilakukan tiga kali, kemudian semua filtrat dikumpulkan menjadi satu lalu diuapkan dengan alat Rotary Evaporator Buchi R-200 melalui penurunan tekanan pada suhu 40-45°C sehingga diperoleh ekstrak kental bawang putih.

5. Ether.

6. Larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%.

7. Formalin 10%, etanol 70%, 80%, 99%, *xylol*, paraffin cair, kaset, *cover slip*, *base mould*, *beker glass*, gelas ukur, thermometer, *cutter*, pinset panjang, *tissue processor* “*auto technicon*”, *hot plate*, *cold plate*, *paraffin dispenser* untuk membuat preparat.
8. *Rotary microtome*, *disposable blade*, kuas cat air kecil no.1, *tissue flotation bath*, kaca obyek, *diamond pencil*, *staining rack*, *hot plate*, aquadestilata.
9. Monoklonal Ab terhadap NF $\kappa$ B, IFN $\gamma$  dan IL-2.

#### **4.5 Instrumen Penelitian**

Penelitian ini memerlukan alat untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba, alat untuk pembiusan, dan alat untuk pengambilan preparat yang akan diperiksa.

#### **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran RSUD Dr. Soetomo untuk pembuatan sediaan yang akan diperiksa.

## **4.7 Prosedur Penelitian**

### **4.7.1 Aklimatisasi**

Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair agar terbiasa hidup dalam lingkungan yang baru, jika terdapat mencit yang sakit atau mati akan dikeluarkan dari penelitian.

### **4.7.2 Pembagian kelompok hewan coba**

Dilakukan randomisasi 27 ekor mencit, yang dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok 1 sampai kelompok 3 masing-masing sebanyak 9 ekor mencit. Mencit pada kelompok 1 tidak diberi ekstrak bawang putih. Mencit pada kelompok 2 dan 3 diberi ekstrak bawang putih.

### **4.7.3 Pelaksanaan penelitian**

Mencit pada kelompok 1 diberi sonde larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5% sebanyak 0,1 ml/10gBB 1x/hari (volume lambung mencit sekitar 0,4cc) setiap hari selama 14 hari (waktu yang diperlukan untuk terbentuknya respon imun ialah 10 hari, maka peneliti menetapkan 14 hari untuk mengurangi resiko kegagalan).

Mencit pada kelompok 2 diberi sonde larutan ekstrak bawang putih 10mg/kgBB sebanyak 0,2-0,3cc tergantung BB 1x/hari setiap hari selama 14 hari (Yudha, 2003). (cara pemberiannya lihat lampiran 2).

Mencit pada kelompok 3 diberi sonde larutan ekstrak bawang putih 20mg/kgBB sebanyak 0,2-0,3cc tergantung BB 1x/hari setiap hari selama 14 hari. ( cara pemberiannya lihat lampiran 2).

Setelah 14 hari mencit pada ketiga kelompok dilakukan euthanasia dengan metode inhalasi menggunakan ether, selanjutnya dilakukan pembedahan abdomen untuk mengambil jaringan usus halus. Kemudian jaringan usus halus mencit pada ketiga kelompok diperiksa persentase jumlah makrofag pengekspresi NFκB, persentase jumlah sel penghasil IFNγ dan persentase jumlah limfosit penghasil IL-2.

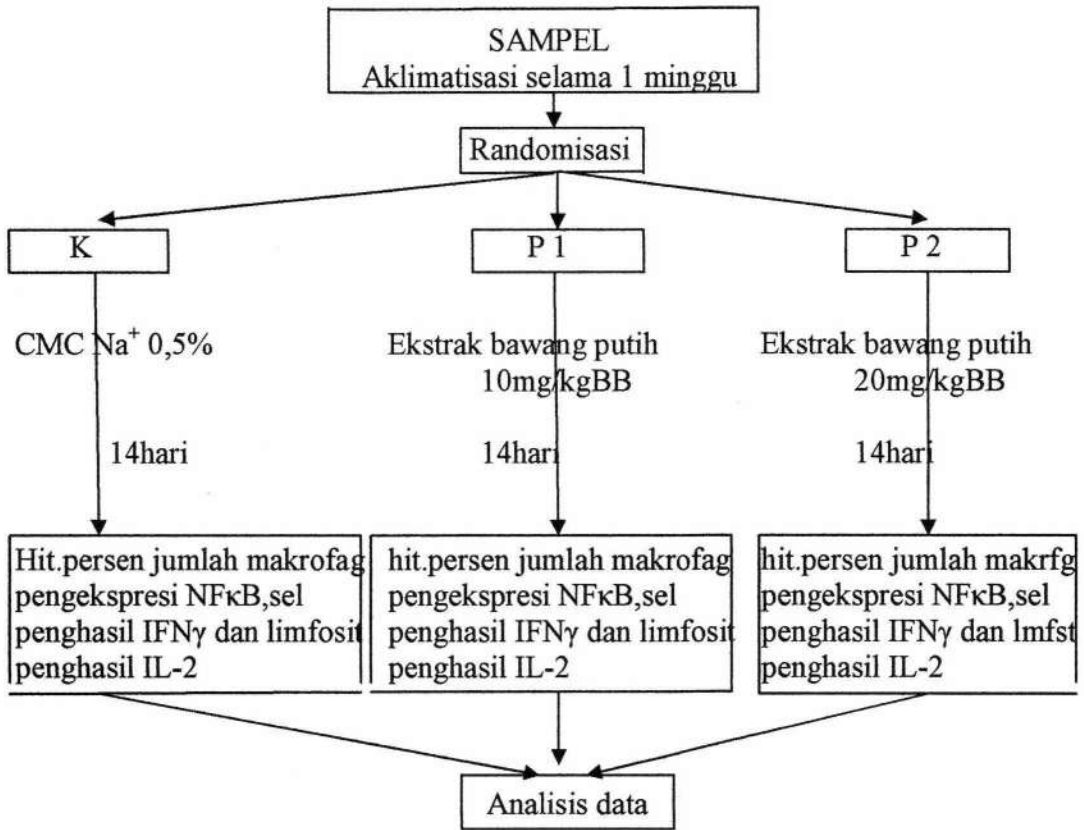
#### **4.8 Tehnik Analisis Data**

Tehnik analisis data yang dipakai menggunakan Anova satu arah (dengan asumsi data homogen, distribusi normal) dengan tingkat kemaknaan sebesar 5%. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, maka untuk mengetahui beda antar perlakuan dipergunakan uji Least Significant Difference (LSD) atau Uji Beda Nyata Terkecil. Jika data tidak homogen menggunakan Brown-Forsythe dilanjutkan dengan Games Howell (Steel dan Torie, 1991).

#### **4.9 Etik Penelitian**

Aspek etik dari penelitian diselesaikan sesuai dengan kaidah yang berlaku.

#### 4.10 Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Operasional Penelitian



## **BAB 5**

# **ANALISIS HASIL PENELITIAN**

## BAB 5

### ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Data Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan hewan coba mencit BALB/c jantan. Penelitian ini untuk mengetahui mekanisme meningkatnya imunitas tubuh akibat pemberian ekstrak bawang putih. Hewan coba berumur 10 minggu dibagi dalam 3 kelompok, yaitu kelompok 1,2, dan 3. Kelompok 1 (K) diberi placebo. Kelompok 2 (P1) diberi ekstrak bawang putih 10mg/kg BB. Kelompok 3 (P2) diberi ekstrak bawang putih 20mg/kg BB. Mencit pada ketiga kelompok dikorbankan pada hari ke 14 untuk dilakukan pengamatan jumlah makrofag pengepresi NF $\kappa$ B, jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  dan jumlah limfosit penghasil IL-2 dengan metode pemeriksaan imunohistokimia indirek.

#### 5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

##### 5.2.1 Jumlah makrofag pengepresi NF $\kappa$ B

Pemeriksaan jumlah makrofag yang mengekspresikan NF $\kappa$ B pada usus halus ketiga kelompok mencit BALB/c jantan dilakukan dengan teknik imunohistokimia. Setiap satu sampel diamati dan dihitung jumlah makrofag yang mengekspresikan NF $\kappa$ B dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x; diamati pada sepuluh lapangan pandang dan dihitung jumlah makrofag yang memberikan reaksi positif terhadap antibodimonoklonal NF $\kappa$ B dibandingkan dengan semua makrofag.

Hasil analisis dengan Kolmogorov-Smirnov satu sampel menunjukkan data jumlah makrofag pengeksresi NFκB masing-masing kelompok berdistribusi normal ( $p>0,05$ ). Data jumlah makrofag pengeksresi NFκB memiliki nilai variansi yang tidak homogen antar kelompok (Levene test  $p<0,05$ ). Untuk itu analisis komparasi antar kelompok dilakukan dengan uji Brown-Forsythe. Hasil analisis sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil analisis jumlah makrofag pengeksresi NFκB

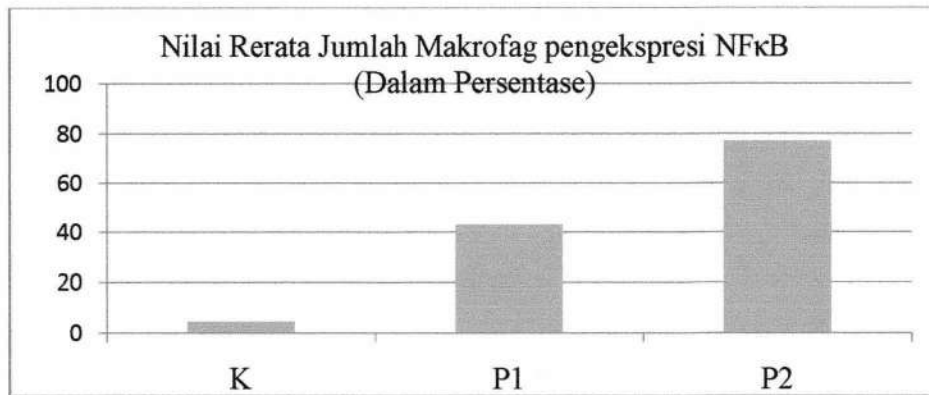
Kelompok	n	Jumlah Makrofag Pengeksresi NFκB(%)				Brown-Forsythe
		$\bar{x}$	SD	Min	Maks	
Kontrol(K)	9	4,44 <sup>a</sup>	1,42	3	7	F=1663,32 p=0,000*
Bawang Putih 10mg/kgBB(P1)	9	43,22 <sup>b</sup>	3,31	40	48	
Bawang Putih 20mg/kgBB(P2)	9	76,89 <sup>c</sup>	2,89	74	82	

Keterangan : \* signifikan pada  $\alpha=0,05$

<sup>a,b,c</sup> superscript yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok (berdasarkan Games-Howell test)

Berdasarkan tabel 5.1 menunjukkan bahwa nilai rerata±SD kelompok kontrol (K) 4,44±1,42, minimum 3 dan maksimum 7; nilai rerata±SD kelompok perlakuan yang diberi bawang putih 10mg/kgBB (P1) ialah 43,22±3,31, minimum 40 dan maksimum 48; nilai rerata±SD kelompok perlakuan yang diberi bawang putih 20mg/kgBB (P2) ialah 76,89±2,89, minimum 74 dan maksimum 82.

Nilai rerata jumlah makrofag pengeksresi NFκB dihitung berdasarkan persentase, hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Nilai rerata jumlah makrofag pengeksresi NFκB

Uji Brown-Forsythe didapatkan nilai  $p=0,000(p<0,05)$  artinya ada perbedaan jumlah makrofag pengeksresi NFκB. Uji Games-Howell untuk beda antar kelompok didapatkan ada perbedaan yang bermakna antara K dan P1; K dan P2; P1 dan P2.

### 5.2.2 Jumlah sel penghasil IFN $\gamma$

Pemeriksaan jumlah sel yang menghasilkan IFN $\gamma$  pada usus halus ketiga kelompok mencit BALB/c jantan dilakukan dengan teknik imunohistokimia. Setiap satu sampel diamati dan dihitung jumlah sel yang menghasilkan IFN $\gamma$  dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x; diamati pada sepuluh lapangan pandang dan dihitung jumlah sel (makrofag dan limfosit) yang memberikan reaksi positif dan negatif terhadap antibodimonoklonal IFN $\gamma$ .

Hasil analisis dengan Kolmogorov-Smirnov satu sampel menunjukkan data jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  masing-masing kelompok berdistribusi normal ( $p>0,05$ ). Data jumlah sel penghasil IFN  $\gamma$  memiliki nilai variansi yang tidak homogen antar

kelompok (Levene test  $p < 0,05$ ). Untuk itu analisis komparasi antar kelompok dilakukan dengan uji Brown-Forsythe. Hasil analisis sebagai berikut:

Tabel 5.2 : Hasil analisis jumlah sel penghasil IFN $\gamma$

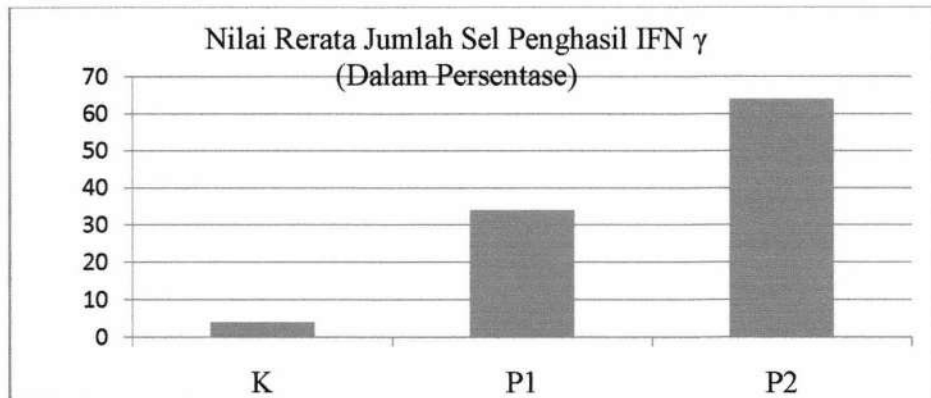
Kelompok	n	Jumlah Sel Penghasil Interferon $\gamma$ (%)				Brown-Forsythe
		$\bar{x}$	SD	Min	Maks	
Kontrol(K)	9	4,00 <sup>a</sup>	0,87	3	5	F=821,45 p=0,000*
Bawang Putih 10mg/kgBB(P1)	9	33,89 <sup>b</sup>	3,98	30	40	
Bawang Putih 20mg/kgBB(P2)	9	63,89 <sup>c</sup>	3,59	60	70	

Keterangan : \* signifikan pada  $\alpha=0,05$

<sup>a,b,c</sup> superscript yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok (berdasarkan Games-Howell test)

Berdasarkan tabel 5.2 menunjukkan bahwa nilai rerata $\pm$ SD kelompok kontrol (K) 4,00 $\pm$ 0,87, minimum 3 dan maksimum 5; nilai rerata $\pm$ SD kelompok perlakuan yang diberi bawang putih 10mg/kgBB (P1) ialah 33,89 $\pm$ 3,98, minimum 30 dan maksimum 40; nilai rerata $\pm$ SD kelompok perlakuan yang diberi bawang putih 20mg/kgBB (P2) ialah 63,89 $\pm$ 3,59, minimum 60 dan maksimum 70.

Nilai rerata jumlah sel penghasil interferon  $\gamma$  dihitung berdasarkan persentase, hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Nilai rerata jumlah sel penghasil interferon  $\gamma$

Uji Brown-Forsythe didapatkan nilai  $p=0,000(p<0,05)$  artinya ada perbedaan jumlah sel penghasil IFN $\gamma$ . Uji Games-Howell untuk beda antar kelompok didapatkan ada perbedaan yang bermakna antara K dan P1; K dan P2; P1 dan P2.

### 5.2.3 Jumlah limfosit penghasil IL-2

Pemeriksaan jumlah limfosit yang menghasilkan IL-2 pada usus halus ketiga kelompok mencit BALB/c jantan dilakukan dengan teknik imunohistokimia. Setiap satu sampel diamati dan dihitung jumlah limfosit yang menghasilkan IL-2 dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x; diamati pada sepuluh lapangan pandang dan dihitung jumlah limfosit yang memberikan reaksi positif dan negatif terhadap antibodimonoklonal IL-2.

Hasil analisis dengan Kolmogorov-Smirnov satu sampel menunjukkan data jumlah limfosit penghasil IL-2 masing-masing kelompok berdistribusi normal ( $p>0,05$ ). Data jumlah limfosit penghasil IL-2 memiliki nilai variansi yang tidak

homogen antar kelompok (Levene test  $p < 0,05$ ). Untuk itu analisis komparasi antar kelompok dilakukan dengan uji Brown-Forsythe. Hasil analisis sebagai berikut:

Tabel 5.3 :Hasil analisis jumlah limfosit penghasil IL-2

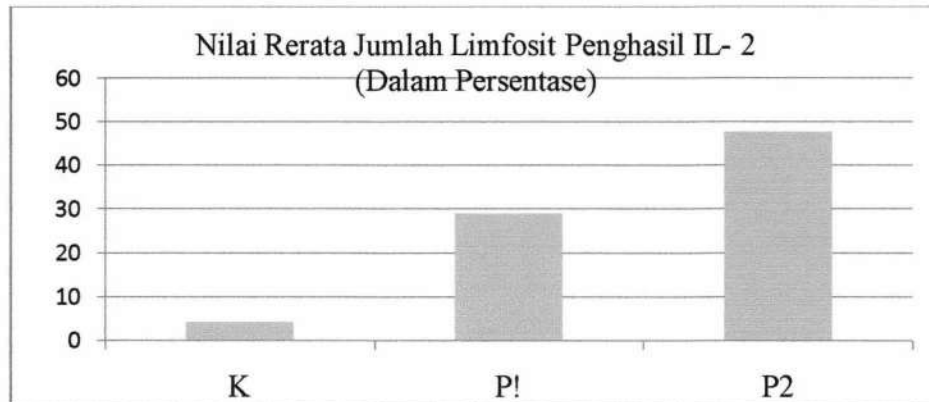
Kelompok	n	Jumlah Limfosit Penghasil Interleukin 2(%)				Brown-Forsythe
		$\bar{x}$	SD	Min	Maks	
Kontrol(K)	9	4,22 <sup>a</sup>	1,09	3	6	F=474,83 p=0,000*
Bawang Putih 10mg/kgBB(P1)	9	29,00 <sup>b</sup>	3,97	25	36	
Bawang Putih 20mg/kgBB(P2)	9	47,78 <sup>c</sup>	3,19	42	52	

Keterangan : \* signifikan pada  $\alpha=0,05$

<sup>a,b,c</sup> superscript yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok (berdasarkan Games-Howell test)

Berdasarkan tabel 5.3 menunjukkan bahwa nilai rerata $\pm$ SD kelompok kontrol (K) 4,22 $\pm$ 1,09, minimum 3 dan maksimum 6; nilai rerata $\pm$ SD kelompok perlakuan yang diberi bawang putih 10mg/kgBB (P1) ialah 29,00 $\pm$ 3,97, minimum 25 dan maksimum 36; nilai rerata $\pm$ SD kelompok perlakuan yang diberi bawang putih 20mg/kgBB (P2) ialah 47,78 $\pm$ 3,19, minimum 42 dan maksimum 52.

Nilai rerata jumlah limfosit penghasil *interleukin* 2 dihitung berdasarkan persentase, hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.3.



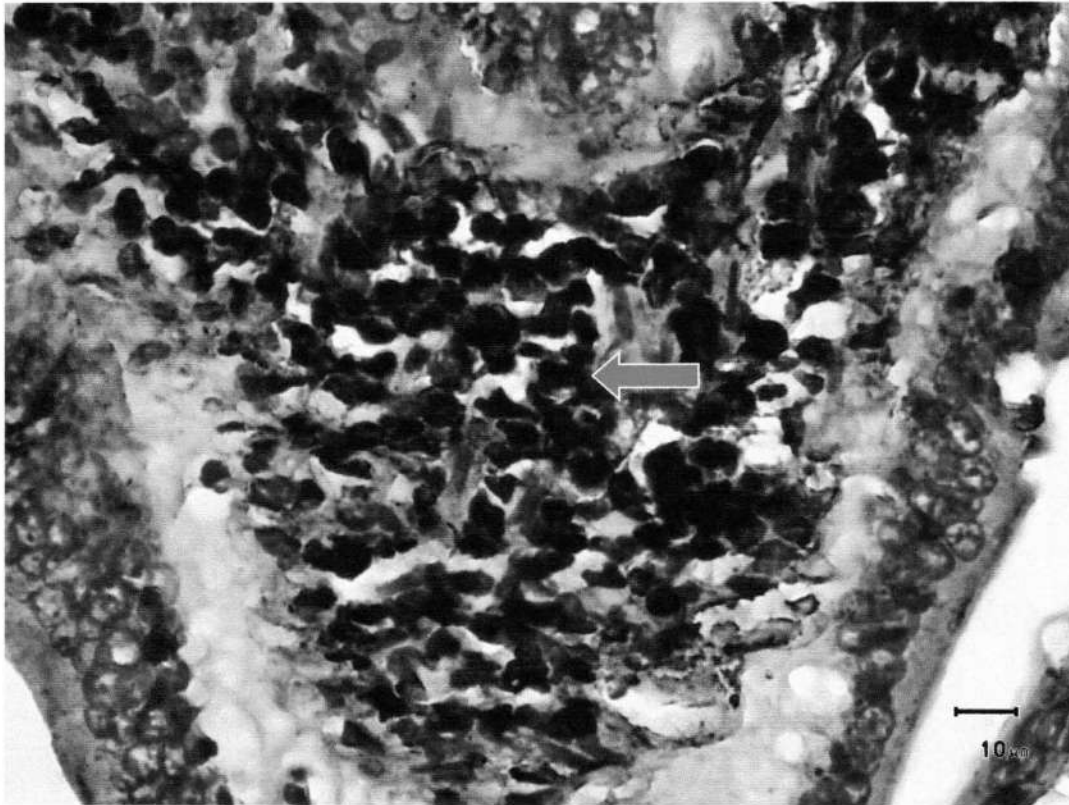
Gambar 5.3 Nilai rerata jumlah limfosit penghasil *interleukin 2*

Uji Brown-Forsythe didapatkan nilai  $p=0,000(p<0,05)$  artinya ada perbedaan jumlah limfosit penghasil IL-2. Uji Games-Howell untuk beda antar kelompok didapatkan ada perbedaan yang bermakna antara K dan P1; K dan P2; P1 dan P2.

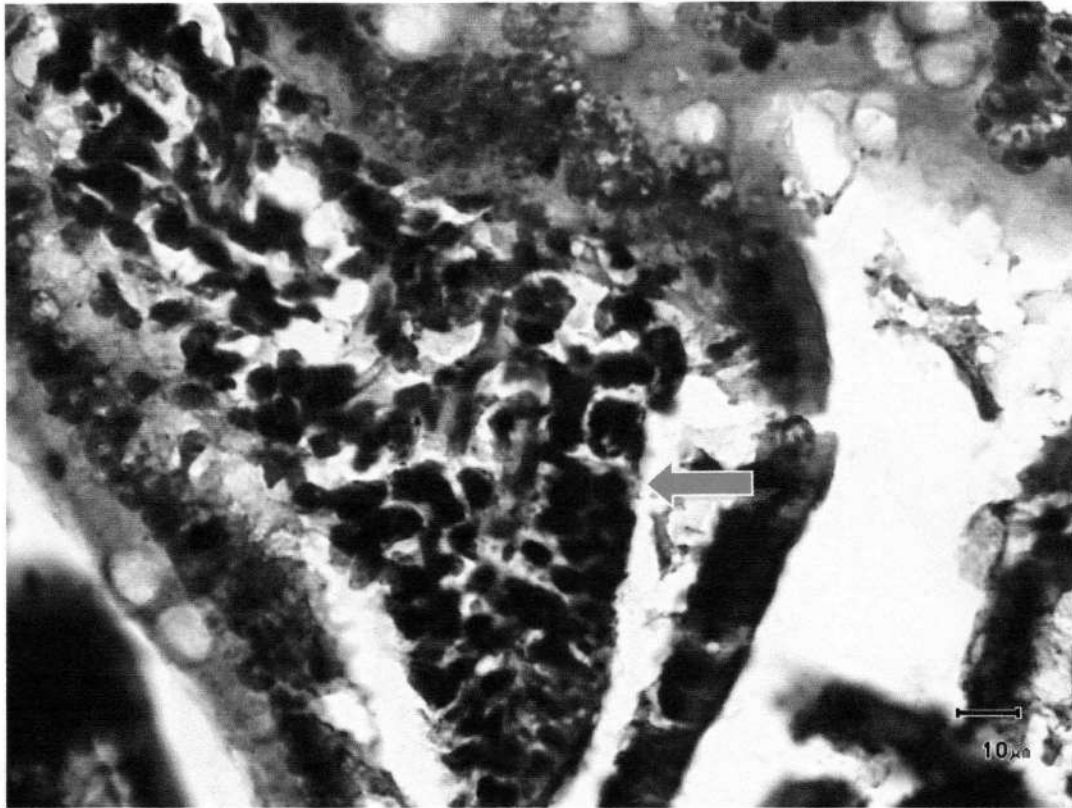
#### 5.2.4 Hasil pewarnaan imunohistokimia

Pada gambar 5.1 – 5.9 dapat dilihat hasil pemeriksaan imunohistokimia untuk mendeteksi makrofag pengepresi NF $\kappa$ B, sel penghasil IFN $\gamma$  dan limfosit penghasil IL-2 pada mukosa usus halus mencit BALB/c jantan, menggunakan antibodi monoklonal. Hasil positif bila terdapat bercak coklat di sitoplasma.

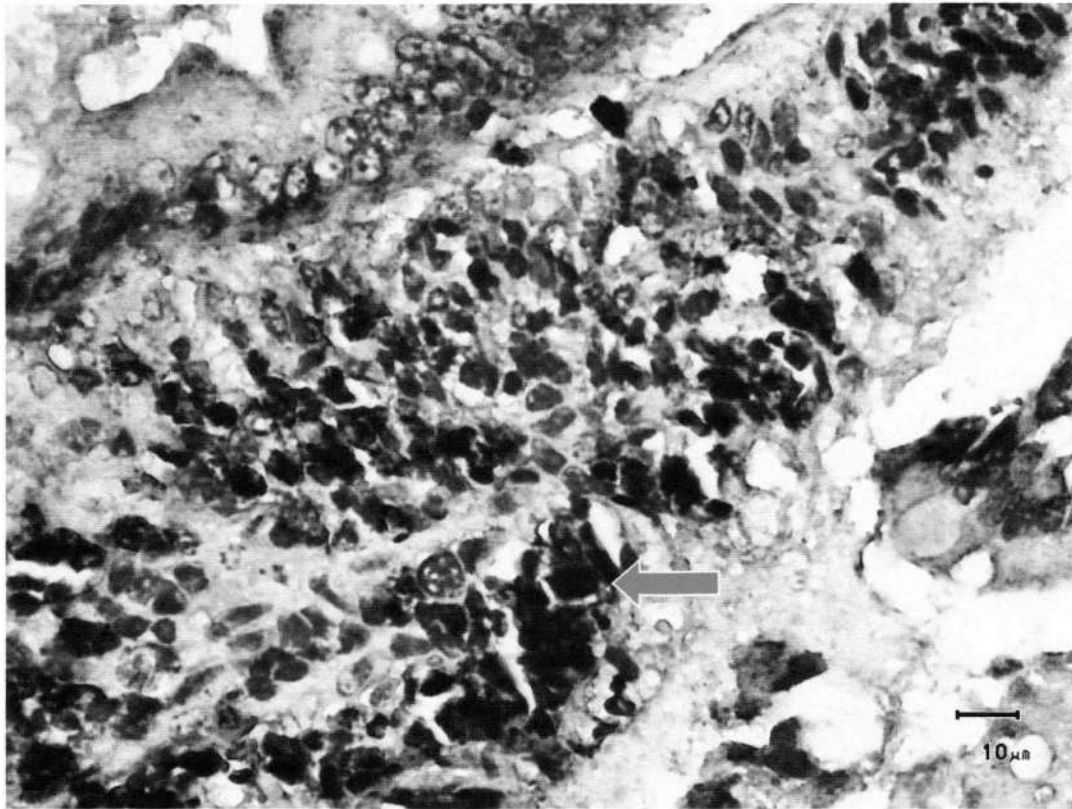




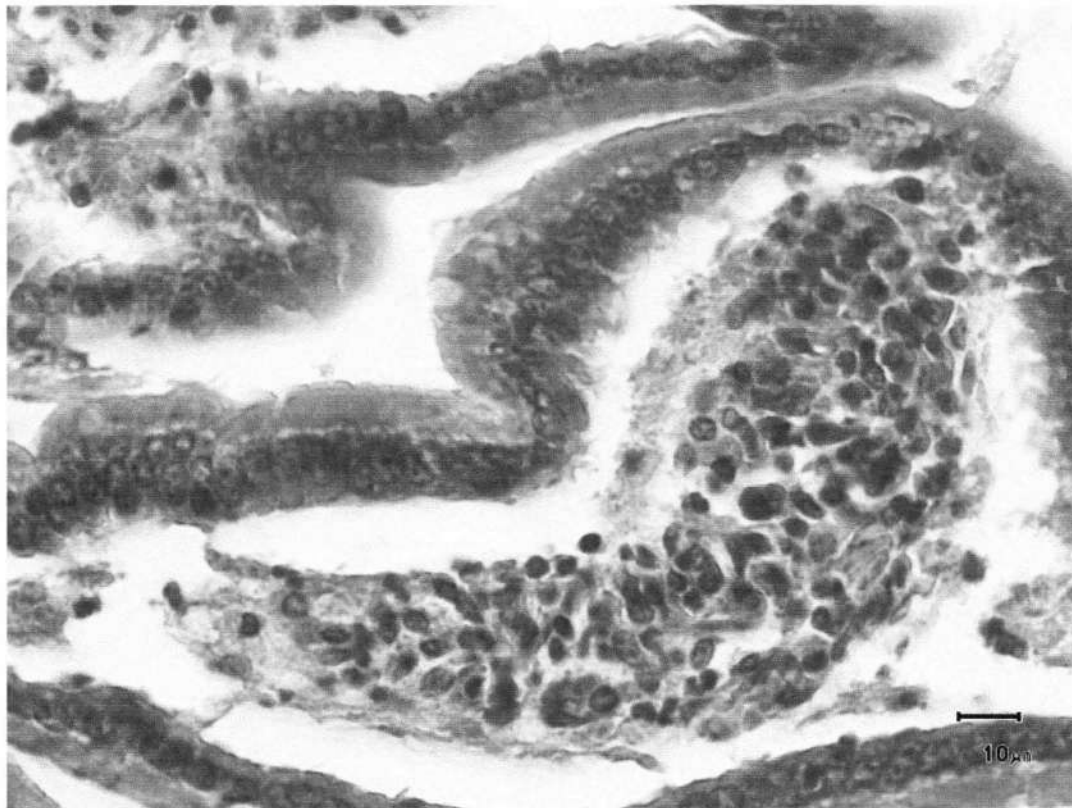
Gambar 5.4 Mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal NF $\kappa$ B pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. Tampak makrofag yang positif dengan sitoplasma berwarna coklat. (Perbesaran 400x)



Gambar 5.5 Mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal  $IFN\gamma$  pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. Tampak makrofag dan limfosit yang positif dengan sitoplasma berwarna coklat. (Perbesaran 400x)



Gambar 5.6 Mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal IL-2 pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. Tampak limfosit yang positif dengan sitoplasma berwarna coklat. (Perbesaran 400x)



Gambar5.7 Mukosa usus halus dengan pewarnaan haematoxylin eosin pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB. (Perbesaran 400x)

## **BAB 6** **PEMBAHASAN**

## BAB 6

### PEMBAHASAN

*Common cold* (flu) ialah peradangan kataralis karena virus pada mukosa hidung yang sering menjalar ke tenggorokan (nasofaring, tonsil dan laring), sehingga dijumpai gejala faringitis akut, tonsillitis akut, dan laringitis akut. *Common cold* lebih merupakan kompleks gejala daripada penyakit. Penyakit ini mudah ditemukan dalam kehidupan sehari-hari bila terjadi penurunan daya tahan tubuh (Boies, 1994).

*Common cold* adalah *self-limiting disease* dan sistem imun *host* adalah hal yang sangat menentukan pada penyakit ini. Respon imun humoral mulai menghasilkan antibodi spesifik dalam beberapa hari untuk mencegah virus menginfeksi sel. Leukosit tersebut juga membunuh virus melalui proses fagositosis dan membunuh sel yang terinfeksi untuk mencegah replikasi virus. Pada pasien dengan imunitas tubuh yang baik dapat sembuh sendiri dalam tujuh hari (Eccles, 2005).

Pada umumnya terapi *common cold* yang digunakan ialah *antihistamin*, *dekongestan*, *antipiretik*, dan *ekspektoran*. Antibiotik digunakan bila terjadi infeksi sekunder (Boies, 1994). Teknik lain yang perlu diberikan ialah dengan meningkatkan imunitas tubuh menggunakan obat *immunomodulator*, salah satunya ialah bawang putih (*Allium sativum* Linn.) (Marta, et al, 2007).

Ekstraksi bawang putih menghasilkan zat yang bersifat anti oksidan yang tidak stabil yaitu *allicin* dan juga zat yang stabil yaitu *S-allylcysteine* dan *S-allylmercaptocysteine*. Kedua komponen ini merupakan senyawa organosulfur

(Borek, 2001). *S-allylcysteine* adalah *immunomodulator* yang efisien melalui stimulasi aktivitas makrofag dan produksi sitokin oleh makrofag (Kang, 2001).

Makrofag merupakan sistem fagositosis mononuklear yang ditemukan pada jaringan tubuh, yang berasal dari monosit dan masuk ke jaringan tubuh, disini dia akan proliferasi menghasilkan sel sejenis. Makrofag yang aktif juga merupakan sel sekretori yang dapat mengeluarkan beberapa substansi penting, termasuk beberapa enzim, lisozim, elastase, kolagenase, dua protein dari sistem komplemen dan gen anti virus penting yaitu interferon (Bevelander, 1988).

Faktor transkripsi *Nuklear Factor Kappa Beta* (NF $\kappa$ B) diaktifkan oleh bermacam-macam stimulasi. NF $\kappa$ B sering disebut sebagai mediator utama pada respon imun. Di inti dari makrofag NF $\kappa$ B menstimulasi proses transkripsi yang menghasilkan interferon gamma (IFN $\gamma$ ) dan *interleukin 12* (IL-12) (Neil, 1997).

Interferon gamma adalah sitokin yang termasuk dalam kelompok interferon tipe II. Interferon ini disebut juga *macrophage activating factor* dan berperan pada *innate and adaptive immunity* terhadap virus, bakteri intraseluler, dan pengontrol tumor. Dibandingkan dengan IFN $\alpha$  dan  $\beta$  yang dapat diekspresikan oleh semua sel, IFN $\gamma$  diproduksi oleh makrofag dan limfosit *T helper 1* (Th1) (Schoenborn, 2007).

*Interleukin 2* disebut juga *T cell growth factor* (TCGF) adalah sitokin yang bertanggung jawab dalam proliferasi limfosit T. IL-2 disintesis oleh sel T yang teraktivasi. IL-2 juga merangsang pertumbuhan sel NK, meningkatkan fungsi

sitolitik, berperan pada sel B sebagai faktor pertumbuhan dan merangsang stimulus antibodi (Abbas, 1994).

Untuk membuktikan pengaruh bawang putih sebagai *immunomodulator*, maka dilakukan penelitian dengan menggunakan hewan coba yaitu mencit BALB/c jantan. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 (K) tidak diberi ekstrak bawang putih. Kelompok 2 (P1) diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 10mg/kgBB (Yudha, 2003). Kelompok 3 (P2) diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 20mg/kgBB. Mencit pada ketiga kelompok dikorbankan pada hari ke 14 untuk dilakukan pengamatan persentase jumlah makrofag pengepresi NFκB, persentase jumlah sel penghasil IFNγ dan persentase jumlah limfosit penghasil IL-2.

Penelitian ini menggunakan metode imunohistokimia *indirect* untuk deteksi adanya NFκB, IFNγ, dan IL-2 pada mukosa usus halus mencit. Pada metode *indirect* ini antibodi sekunder yang dilabel enzim akan berikatan dengan antibodi primer yang telah berikatan dengan antigen. Untuk menandai adanya suatu reaksi enzimatik di dalam jaringan maka digunakan indicator warna (*chromogen*) DAB (3,3 *diaminobenzidine*) yang akan memberikan warna coklat di antara sitoplasma sel normal yang terwarnai sesuai *counter stain haematoxylin*, dihitung dalam persen dan dibandingkan antar kelompok (Sudiana, 2008).

Hasil pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini menunjukkan data jumlah makrofag pengeksresi NFκB, sel penghasil interferon γ, dan limfosit penghasil *interleukin 2* masing-masing kelompok berdistribusi normal ( $p>0,05$ ) (Analisis



dengan Kolmogorov-Smirnov satu sampel) , tetapi data tersebut memiliki nilai variansi yang tidak homogen antar kelompok (Levene test  $p < 0,05$ ). Untuk itu analisis komparasi antar kelompok dilakukan dengan uji Brown-Forsythe. Uji beda antar kelompok menggunakan Games-Howell.

Pada percobaan ini jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B ditunjukkan pada tabel 5.1. Didapatkan bahwa antara K dan P1 didapat nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B pada K (tidak diberi ekstrak bawang putih) dan P1 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 10mg/kgBB). Pada K jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B normal dan pada P1 jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B tinggi.

Antara K dan P2 didapat nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B pada K (tidak diberi ekstrak bawang putih) dan P2 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 20mg/kgBB). Pada K jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B normal dan pada P2 jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B tinggi.

Antara P1 dan P2 didapat nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B pada P1 (diberi ekstrak bawang putih 10mg/kgBB) dan P2 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 20mg/kgBB). Pada P2 jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B lebih tinggi daripada P1.

Pada percobaan ini jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  ditunjukkan pada tabel 5.2. Didapatkan bahwa antara K dan P1 didapat nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), artinya ada

perbedaan jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  pada K (tidak diberi ekstrak bawang putih) dan P1 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 10mg/kgBB). Pada K jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  normal dan pada P1 jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  tinggi.

Antara K dan P2 didapat nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  pada K (tidak diberi ekstrak bawang putih) dan P2 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 20mg/kgBB). Pada K jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  normal dan pada P2 jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  tinggi.

Antara P1 dan P2 didapat nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  pada P1 (diberi ekstrak bawang putih 10mg/kgBB) dan P2 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 20mg/kgBB). Pada P2 jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  lebih tinggi daripada P1.

Pada percobaan ini jumlah limfosit penghasil IL-2 ditunjukkan pada tabel 5.3. Didapatkan bahwa antara K dan P1 didapat nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah limfosit penghasil IL-2 pada K (tidak diberi ekstrak bawang putih) dan P1 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 10mg/kgBB). Pada K jumlah limfosit penghasil IL-2 normal dan pada P1 jumlah limfosit penghasil IL-2 tinggi.

Antara K dan P2 didapat nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah limfosit penghasil IL-2 pada K (tidak diberi ekstrak bawang putih) dan P2 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 10mg/kgBB). Pada K jumlah limfosit penghasil IL-2 normal dan pada P2 jumlah limfosit penghasil IL-2 tinggi.

Antara P1 dan P2 didapat nilai  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ), artinya ada perbedaan jumlah limfosit penghasil IL-2 pada P1 (diberi ekstrak bawang putih 10mg/kgBB) dan P2 (diberi ekstrak bawang putih dengan dosis 20mg/kgBB). Pada P2 jumlah limfosit penghasil IL-2 lebih tinggi daripada P1.

Berdasar data diatas didapat bahwa pemberian ekstrak bawang putih dapat meningkatkan jumlah makrofag pengekspresi NF $\kappa$ B, jumlah sel penghasil IFN $\gamma$ , dan jumlah limfosit penghasil IL-2 di jaringan usus halus mencit. Hal ini disebabkan karena kandungan organosulfur dalam bawang putih yaitu *S-allylcysteine* (Kang, 2001).

*S-allylcysteine* merupakan protein asing yang dapat menstimuli makrofag. *S-allylcysteine* berikatan dengan reseptor pada permukaan sel makrofag. Kompleks ini akan mengambil molekul yang berisi *tumor necrosis factor receptor associated death domain* (TRADD) yang akan berinteraksi dengan *Serine-Threonine* kinase *ribosome inhibiting protein* (RIP) dan *tumor necrosis factor receptor associated factor 2* (TRAF2). Keduanya akan mengaktifkan *transforming growth factor beta activated kinase 1* (TAK1). TAK1 yang aktif berperan terhadap fosforilasi *inhibitor kinase kappa beta* (IK $\kappa$ B). IK $\kappa$ B menyebabkan degradasi *inhibitor kappa beta* (I $\kappa$ B). Hambatan pada I $\kappa$ B akan mengaktifkan *nuclear factor kappa beta* (NF $\kappa$ B) sehingga terjadilah translokasi NF $\kappa$ B aktif ke inti sel (George, 2002). Di inti NF $\kappa$ B menstimuli proses transkripsi yang menghasilkan interferon gamma (IFN $\gamma$ ) dan *interleukin 12* (IL-12) (Neil, 1997). Berdasarkan penelitian ini dapat dibuktikan bahwa bawang putih dapat menstimuli makrofag untuk mengekspresikan NF $\kappa$ B sehingga terjadi

proses transkripsi dan menghasilkan IFN $\gamma$  dan IL-12. Hal ini dapat dilihat pada tabel 5.1 dan 5.2.

IL-12 memainkan peranan penting dalam aktivitas sel *Natural Killer* (NK) dan limfosit T. Dia dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik dari sel NK dan Cluster of Differentiation (CD)8+*cytotoxic T lymphocytes* (CTL). IL-12 disebut juga *T cell stimulating factor*, yang dapat menstimuli pertumbuhan dan fungsi limfosit T. Limfosit T yang terbentuk akan berdiferensiasi menjadi sel *T helper 1* dan *T helper 2*. Sel *T helper 1* (Th1) yang terbentuk dapat memproduksi sitokin yang disebut IFN $\gamma$  dan *interleukin 2* (IL-2) (Abbas, 1994). Hal ini dapat dilihat pada tabel 5.2 dan 5.3.

IFN- $\gamma$  yang dihasilkan sel makrofag dan sel limfosit Th1 ini bersamaan dapat meningkatkan aktivitas sel NK untuk membunuh sel yang mengandung virus dan membuat blokade reseptor pada sel tetangga sehingga sel tetangga kebal terhadap infeksi virus (Anthony, 2003). IL-2 juga merangsang pertumbuhan sel NK dan meningkatkan fungsi sitolitiknya (Abbas, 1994).

Sel NK adalah limfosit yang besar dan bergranul serta bersifat sitotoksik yang merupakan komponen utama dari *innate immune system*. Sel NK berfungsi memfagosit sel virus atau sel yang terinfeksi virus, yang dibunuh dengan melepaskan granulae sitoplasma kecil dari protein yang disebut *perforin* dan *granzyme* yang menyebabkan sel target mengalami apoptosis. *Perforin* akan melubangi membran sel dari sel target dimana *granzyme* dapat masuk melaluinya dan menginduksi apoptosis. Apoptosis berbeda dengan lisis, bila sel mengalami lisis maka virus yang ada di

dalam sel akan keluar. Pada peristiwa apoptosis virus yang berada di dalam sel akan hancur. Mereka membunuh virus lebih dahulu sebelum respon imun adaptif mulai bekerja (Abbas A.K, 1994), sehingga tubuh tidak mudah terinfeksi virus. Pada kasus dimana penderita sudah menderita penyakit akibat infeksi virus seperti *common cold*, maka pemberian ekstrak umbi bawang putih dapat memperpendek gejala dan derajat keparahannya.

Pemberian ekstrak umbi bawang putih pada mencit BALB/c jantan selama 14 hari dapat meningkatkan imunitas alami tubuh melalui peningkatan jumlah makrofag, pengekspresi NF $\kappa$ B, sel penghasil interferon  $\gamma$ , dan limfosit penghasil *interleukin 2*.

## **BAB 7 PENUTUP**



## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

1. Jumlah makrofag pengekspresi NF $\kappa$ B pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih.
2. Jumlah sel penghasil IFN $\gamma$  pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih.
3. Jumlah limfosit penghasil IL-2 pada mencit yang diberi ekstrak bawang putih lebih besar jumlahnya dibandingkan pada mencit yang tidak diberi ekstrak bawang putih.

Pemberian ekstrak umbi bawang putih pada mencit BALB/c jantan dapat meningkatkan imunitas tubuh melalui peningkatan jumlah makrofag pengekspresi NF $\kappa$ B, sel penghasil interferon  $\gamma$ , dan limfosit penghasil *interleukin 2*.

## 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian pada manusia (setelah uji toksisitas) apakah pemberian ekstrak bawang putih akan memberi hasil serupa yaitu peningkatan jumlah makrofag pengeksresi NF $\kappa$ B, jumlah sel penghasil IFN $\gamma$ , dan jumlah limfosit penghasil IL-2.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ekstraksi zat aktif yang terdapat dalam ekstrak bawang putih dan khasiat khususnya.



## DAFTAR PUSTAKA

### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K, Andrew H.L, 1994. Cellular and Molecular Immunology. 2<sup>nd</sup> edition, USA: W.B. Saunders Company, 18, 53, 55, 262, 208-9, 251-2, 328.
- Anthony R.F, Wayne M.Y, 2003. Natural Killer Cells and Viral Infections. Current Opinion in Immunology 15: 45-51.
- Atal CK, Kapur BM, 1982. Cultivation and Utilization of Aromatic Plants, Regional Research Laboratory, Council of Scientific and Industrial Research. Jamu Tawi India, pp561,744.
- Bevelander G, Ramaley J, 1988. Dasar-Dasar Histology (Essentials of Histology). 8<sup>th</sup> edition, Jakarta: Erlangga, 177-178.
- Boies, Adams, Higler, 1994. Buku Ajar Penyakit THT (Boies Fundamentals of Otolaryngology). 1<sup>st</sup> edition, Jakarta:EGC, 206-208.
- Borek C, 2001. Antioxidant Health Effect of Aged Garlic Extract. Journal of Nutrition American Society for Nutritional Sciences 131: 1010s-1015s.
- Diah K, 2004. Bersahabat Dengan Hewan Coba. Cetakan I, Yogyakarta:Gadjah Mada University Press, 5-8, 25-37, 66-69, 82-112.
- Eccles R, 2005. Understanding The Symptoms of The Common Cold and Influenza. Lancet Infect Diseases 5:718-25.
- Eikai K, Naoto U, 2001. Immunomodulatory Effects of Aged Garlic Extract. Journal of Nutrition 131: 1075-1079.
- Eko B, 2002. Biostatistika. Cetakan I, Jakarta:EGC, 226-232.
- Federer, 1955. Experimental Design, Theory and Application. 2<sup>nd</sup> edition, New York Macmillan.
- George S, 2002. NF $\kappa$ B-Dependent Signaling Pathways. Experimental Hematology 30: 285-296.
- Hildebert W, 1999. Immunomodulatory Agents from Plants. Medical :274-277.
- Hirao Y, 1987. Activation of Immunesponder Cells by The Protein Fraction from Aged Garlic Extract. Phytotherapy 1:161-164.
- John D.B, Harry C.C, 1984. Manual of Histological Techniques. New York:Churcill livingstone Inc, 12-25,195-202.

- Kang N.S, Moon E.Y, 2001. Immunomodulating Effect of Garlic Component, Allicin, on Murine Peritoneal Macrophages. *Nutrition Research* 21: 617-626.
- Liang H.O, Purwanto A, 1991. Uji Toksisitas dan Aktivitas Biologi Ekstrak Bawang Putih. *Cermin Dunia Kedokteran* 73, 28.
- Luna L.G, 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. 3<sup>rd</sup> edition, USA: Mc.Graw Hill Book Company, 1-32.
- Marta CM, Nieves C, Mar V, 2007. Biological Properties of Onions and Garlic. *Food Science and Technology* 18: 609-625.
- Marcel V, 2009. Moral Principles for Allocating Scarce Medical Resources in an Influenza Pandemic. *Bioethical Inquiry* 6: 159-169.
- Miriam P, 2004. Allicin Stimulates Lymphocytes and Elicits an Anti Tumor Effect: a Possible Role of P21. *International immunology* 16: 275-281.
- Naoko M, Lan L, 1993. A Protein Fraction from Aged Garlic Extract Enhances Cytotoxicity and Proliferation of Human Lymphocytes Mediated by Interleukin2 and Concanavalin A. *Cancer Immunology Immunotherapy* 37: 316-322.
- Neil P, 1997. Achieving Transcriptional Specificity with NF $\kappa$ B. *Int.J.Biochem. Cell Biology* 29: 1433-1448.
- Purseglove J.W, 1985. *Tropical Crops: Monocotyledons*. English Language Book Society, Longman Singapore Publisher Ltd.
- Sage R, Atchley W, 1993. House Mice as Models in Systematic Biology. *Systematic Biology* 42: 523-561.
- Schoenborn J.R, Wilson C.B, 2007. Regulation of Interferon Gamma During Innate and Adaptive Immune Responses, *Immunol* 96:41-101.
- Schroeder K, Hertzog PJ, Ravasi T, 2004. Interferon Gamma: an Overview of Signals, Mechanisms and Functions, *J Leukoc.Biol* 75: 163-89.
- Steel R.G.D., Torrie J.H, 1984. *Principles and Procedures of Statistics*. Singapore: McGraw Hill Book Co., Inc., 172-177.
- Steven E, MD, 2009. Common Cold. <http://www.medicineNet.com/>
- Sudiana IK, 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika, 61-88.
- Sudiana IK, 2005. *Teknologi Ilmu Jaringan dan Imunohistokimia*. Jakarta: Sagung Seto, 1-46.

- Supriyanto S, 2003. Metodologi Riset. Surabaya: Administrasi dan Kebijakan Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga, 56,69-95.
- Tzou-C.H, 2009. Diallyl Disulphide, but not Diallyl Sulphide, Increases Leucocyte Function-Associated Antigen-1 Expression and Cellular Adhesion in Monocytes. Food Chemistry 1-14.
- Yudha, JS, 2003. The Role of Garlic (*Allium Sativum*) Antioxidant as Hepatoprotektor. Jurnal Universitas Airlangga. 4(1):24-31.

## LAMPIRAN



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

**No. 06/EC/KEPK/FKUA/2010**

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Umbi Bawang Putih (*Allium Sativum* Linn.) Terhadap Jumlah Makrofag Pangekspresi NFkB, Sel Penghasil Interferon  $\gamma$ , dan Limfosit Penghasil Interleukin 2 Pada Mencit Balb/c**

PENELITI UTAMA :

**Titiek Sunaryati, dr (NIM: 090810170/M)**

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

**Lab. Biokimia FK Unair dan Lab. Patologi FK Unair/ RSUD Dr. Soetomo**

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Surabaya, 15 Februari 2010



**Prof. M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS**

## Lampiran 2: Cara membuat ekstrak bawang putih

Umbi bawang putih dikupas kulit luarnya, dicuci bersih dan diiris tipis-tipis, kemudian diangin-anginkan hingga kering. Selanjutnya irisan bawang tersebut dibuat serbuk. Serbuk bawang putih kemudian dilarutkan dalam etanol 96% dengan metode maserasi ( bahan direndam etanol 1x24 jam hingga etanolnya menguap, lalu disaring untuk diambil filtratnya). Ampas bawang putih dimaserasi kembali selama 1x24 jam, kemudian diambil filtratnya. Pengambilan filtrat dilakukan tiga kali, kemudian semua filtrat dikumpulkan menjadi satu lalu diuapkan dengan alat Rotary Evaporator Buchi R-200 melalui penurunan tekanan pada suhu 40-45°C sehingga diperoleh ekstrak kental bawang putih. (Dari 750 gr basah bawang putih didapatkan 250 gr kering bawang putih, setelah diekstrak didapatkan 15,5 gr ekstrak bawang putih)

Cara membuat larutan ekstrak bawang putih:

Ekstrak bawang putih disuspensikan dalam larutan CMC Na<sup>+</sup> 0,5%. (0,5 gr CMC dilarutkan dalam 100ml aquabidest)

Lampiran 3: Cara menghitung dosis larutan ekstrak bawang putih untuk mencit

Dosis 10 mg/kg BB sama dengan 10 mg/1000g BB sama dengan 0,1 mg/10g BB.

0,1 mg/10g BB identik dengan 0,1 ml/10 gBB jadi 0,1 mg identik dengan 0,1 ml.

Contoh: pada mencit dengan berat badan 30gr diberi larutan ekstrak bawang putih 3 x  
0,1 ml = 0,3 ml.

Jadi 10 mg sama dengan 10 ml, artinya ekstrak 10 mg ditambahkan dengan larutan CMC Na<sup>+</sup> sampai 10 ml. Untuk kebutuhan selama 14 hari 9 ekor mencit kami menyiapkan 50 mg ekstrak bawang putih kemudian ditambahkan dengan larutan CMC Na<sup>+</sup> sampai 50 ml.

Pada dosis 20 mg/kg BB untuk kebutuhan selama 14 hari 9 ekor mencit kami menyiapkan 100 mg ekstrak bawang putih kemudian ditambahkan dengan larutan CMC Na<sup>+</sup> sampai 50 ml.



## Lampiran 4: Prosedur Pemeriksaan Imunohistokimia

1. Lakukan deparaffinisasi dengan cara memasukkan sayatan jaringan ke dalam xylol sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
2. Dilakukan hidrasi :
  - etanol absolute selama 5 menit
  - etanol 95% selama 5 menit
  - etanol 80% selama 5 menit
3. Dicuci dengan aquadest selama 10 menit
4. Masukkan sediaan ke dalam cairan retrieval (DAKO) 1:10, kemudian masukkan ke dalam microwave :
  - a. Dengan temperature tinggi sampai mendidih (3-4 menit)
  - b. Dengan temperature rendah selama 27 menitKeluarkan sediaan dari microwave, biarkan sampai larutan retrieval jernih dan dingin antara 45-60 menit)
5. Inkubasi dengan Proteinase-K selama 15 menit dalam suhu kamar
6. Cuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 5 menit)
7. Inkubasi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 10 menit, temperature ruangan
8. Cuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 5 menit)
9. Dicuci dengan aquadest selama 10 menit
10. Cuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 5 menit)
11. Masukkan ke dalam monoclonal antibody primer rat anti mouse :30 menit
12. Cuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 5 menit)
13. Masukkan ke dalam monoclonal sekunder antibody rabbit anti rat : 30 menit
14. Cuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 5 menit)
15. Masukkan ke dalam streptavidin/avidin HRP label :30 menit
16. Cuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 5 menit)
17. Masukkan ke dalam substrat kromogen :10 menit
18. Cuci dengan PBS 2 kali (masing-masing 5 menit), kemudian dibilas dengan aquadestilata
19. Counter stain dengan haematoxylin selama 6 menit
20. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit
21. Dehidrasi-clearing-mounting

Lampiran 5: Teknik pemrosesan jaringan dengan teknik rutin dan teknik pengecatan Haematoksilin Eosin.

A. Teknik Pemrosesan jaringan dengan teknik rutin

1. Melakukan proses fiksasi, dehidrasi, clearing dan impregnasi dengan cara mencelupkan jaringan ke dalam larutan seperti dibawah ini sesuai waktu yang telah ditentukan.

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1	Formalin 10%	2jam	Fiksasi
2	Etanol 70%	1jam	Dehidrasi
3	Etanol 80%	2jam	Dehidrasi
4	Etanol 95%	2jam	Dehidrasi
5	Etanol 96%+prusi	2jam	Dehidrasi
6	Etanol 96%+prusi	1jam	Dehidrasi
7	Etanol 96%+prusi	2jam	Dehidrasi
8	Xylol	1jam	Clearing
9	Xylol	2jam	Clearing
10	Xylol	2jam	Clearing
11	Paraffin cair(58-60°C)	2jam	Impregnasi
12	Paraffin cair(58-60°C)	2jam	Impregnasi

2. Embedding dan penyayatan jaringan dengan mikrotom

-Alat cetak yang terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun di atas permukaan kaca yang sudah diolesi gliserin. Penggunaan gliserin ini untuk mempermudah pemisahan alat cetak dari blok paraffin yang sudah beku.

-Dua tempat paraffin cair, yaitu paraffin sebagai bahan embedding dan paraffin dengan temperature optimum tetapi tidak mengembangkan alat cetak blok.

-Paraffin cair pada tempat pertama dituangkan ke dalam alat cetak hingga penuh pada permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata.

-Alat cetak dilepas bila paraffin sudah cukup keras, lalu blok jaringan diberi label dan siap disayat.

-Blok paraffin tadi ditempelkan kepada alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong, kemudian didinginkan pada suhu kamar agar melekat erat.

-Pisau mikrotom dipasang pada pegangan mikrotom membentuk sudut 5-10°. Pisau harus diusahakan selalu tajam dan permukaannya rata benar.

-*Water bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air di bawah titik leleh paraffin( $\pm 48^{\circ}\text{C}$ ).

-Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada mikrotom dan siap dilakukan pemotongan tipis dengan ketebalan yang dikehendaki, umumnya 4-8 mikron.

-Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan ke dalam *water bath* agar sayatan jaringan mengembang dengan baik.

-Sayatan diseleksi dan dipindahkan ke atas kaca objek yang telah diolesi dengan mayer albumin (putih telur) atau polilisin sebagai bahan perekatnya dan sudah diberi label sesuai label pada blok.

-Sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu optimum (58-60°C) selama 30 menit, dan sediaan siap dicat.

#### B. Teknik Pengecatan Haematoksilin Eosin

1. Sediaan dicelup dalam larutan xylol bak I selama 2 menit.
2. Pindahkan dalam larutan xylol II selama 2 menit.
3. Dalam etanol absolute 2 bak, bak I, bak II, masing-masing 1 menit.
4. Dalam etanol 95% 2 bak, bak I, bak II, masing-masing 1 menit.
5. Cuci dalam air yang mengalir selama 10 menit.
6. Masukkan dalam larutan mayer haematoksilin selama 15 menit.
7. Cuci kembali dengan air.
8. Masukkan dalam eosin antara 15 detik sampai 2 menit.
9. Dalam etanol 95%, bak I, bak II, masing-masing 1 menit.
10. Dalam etanol absolute, bak I,II,III, masing-masing 2 menit.
11. Terakhir, dalam xylol bak I,II,III, masing-masing 2 menit.
12. Mounting.

## Lampiran 6: Data jumlah makrofag pengeksresi NFκB

Pada kelompok yang tidak mendapat bawang putih

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	2	38	5
2.	7	86	7
3.	2	61	3
4.	2	55	4
5.	3	47	4
6.	7	114	6
7.	7	129	5
8.	3	109	3
9.	2	53	3

Pada kelompok yang mendapat bawang putih 10mg/kgBB

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	21	29	41
2.	35	51	41
3.	30	15	45
4.	23	32	41
5.	49	53	48
6.	58	62	48
7.	41	49	45
8.	22	33	40
9.	40	60	40

Pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	89	31	74
2.	65	21	75
3.	72	20	78
4.	90	25	78
5.	83	21	80
6.	73	16	82
7.	66	20	77
8.	111	39	74
9.	89	31	74

Lampiran 7: Data jumlah sel penghasil Interferon  $\gamma$ 

Pada kelompok yang tidak mendapat bawang putih

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	6	125	5
2.	5	90	5
3.	9	172	5
4.	5	146	3
5.	6	142	4
6.	3	84	4
7.	4	116	3
8.	5	109	4
9.	6	184	3

Pada kelompok yang mendapat bawang putih 10mg/kgBB

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	33	76	30
2.	37	75	33
3.	50	115	30
4.	67	124	35
5.	80	120	40
6.	50	75	40
7.	28	59	32
8.	35	65	35
9.	53	122	30

Pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	70	47	60
2.	47	25	65
3.	61	27	70
4.	127	63	67
5.	81	54	60
6.	61	38	62
7.	44	23	66
8.	74	49	60
9.	109	58	65

## Lampiran 8: Data jumlah limfosit penghasil interleukin 2

Pada kelompok yang tidak mendapat bawang putih

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	3	47	5
2.	2	58	4
3.	1	43	3
4.	1	24	3
5.	3	52	5
6.	1	19	6
7.	1	13	5
8.	1	17	3
9.	2	43	4

Pada kelompok yang mendapat bawang putih 10mg/kgBB

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	10	30	25
2.	20	38	34
3.	13	30	30
4.	11	24	30
5.	14	26	36
6.	9	25	25
7.	11	28	28
8.	8	22	28
9.	11	32	25



Pada kelompok yang mendapat bawang putih 20mg/kgBB

No.	Positif	Negatif	Persentase
1.	20	27	42
2.	18	23	45
3.	18	17	50
4.	15	14	50
5.	22	23	48
6.	17	21	45
7.	16	14	52
8.	11	11	48
9.	9	9	50

Lampiran 9 : Perhitungan statistik

**NPar Tests****Kelompok perlakuan = Kontrol**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test<sup>c</sup>

		Interferon Gamma	Interleukin 2	NFKB
N		9	9	9
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	4.00	4.22	4.44
	Std. Deviation	.866	1.093	1.424
Most Extreme Differences	Absolute	.209	.206	.178
	Positive	.209	.202	.178
	Negative	-.209	-.206	-.155
Kolmogorov-Smirnov Z		.628	.618	.534
Asymp. Sig. (2-tailed)		.826	.839	.938

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Kelompok perlakuan = Kontrol

**Kelompok perlakuan = Ekstrak Bawang Putih 10 mg**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test<sup>c</sup>

		Interferon Gamma	Interleukin 2	NFKB
N		9	9	9
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	33.89	29.00	43.22
	Std. Deviation	3.983	3.969	3.308
Most Extreme Differences	Absolute	.169	.178	.305
	Positive	.169	.178	.305
	Negative	-.164	-.157	-.165
Kolmogorov-Smirnov Z		.507	.535	.914
Asymp. Sig. (2-tailed)		.959	.937	.374

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Kelompok perlakuan = Ekstrak Bawang Putih 10 mg

**Kelompok perlakuan = Ekstrak Bawang Putih 20 mg****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test<sup>c</sup>**

		Interferon Gamma	Interleukin 2	NFKB
N		9	9	9
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	63.89	47.78	76.89
	Std. Deviation	3.586	3.193	2.892
Most Extreme Differences	Absolute	.194	.201	.188
	Positive	.194	.141	.188
	Negative	-.177	-.201	-.159
Kolmogorov-Smirnov Z		.583	.604	.563
Asymp. Sig. (2-tailed)		.886	.859	.909

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Kelompok perlakuan = Ekstrak Bawang Putih 20 mg

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
					Interferon Gamma	Kontrol			9
	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	9	33.89	3.983	1.328	30.83	36.95	30	40
	Ekstrak Bawang Putih 20 mg	9	63.89	3.586	1.195	61.13	66.65	60	70
	Total	27	33.93	25.097	4.830	24.00	43.85	3	70
Interleukin 2	Kontrol	9	4.22	1.093	.364	3.38	5.06	3	6
	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	9	29.00	3.969	1.323	25.95	32.05	25	36
	Ekstrak Bawang Putih 20 mg	9	47.78	3.193	1.064	45.32	50.23	42	52
	Total	27	27.00	18.406	3.542	19.72	34.28	3	52
NFKB	Kontrol	9	4.44	1.424	.475	3.35	5.54	3	7
	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	9	43.22	3.308	1.103	40.68	45.77	40	48
	Ekstrak Bawang Putih 20 mg	9	76.89	2.892	.964	74.67	79.11	74	82
	Total	27	41.52	30.272	5.826	29.54	53.49	3	82

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Interferon Gamma	7.534	2	24	.003
Interleukin 2	4.269	2	24	.026
NFKB	5.297	2	24	.012

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Interferon Gamma	Between Groups	16140.074	2	8070.037	821.455	.000
	Within Groups	235.778	24	9.824		
	Total	16375.852	26			
Interleukin 2	Between Groups	8590.889	2	4295.444	474.829	.000
	Within Groups	217.111	24	9.046		
	Total	8808.000	26			
NFkB	Between Groups	23656.074	2	11828.037	1663.318	.000
	Within Groups	170.667	24	7.111		
	Total	23826.741	26			

## Robust Tests of Equality of Means

		Statistic <sup>a</sup>	df1	df2	Sig.
Interferon Gamma	Brown-Forsythe	821.455	2	16.642	.000
Interleukin 2	Brown-Forsythe	474.829	2	16.672	.000
NFkB	Brown-Forsythe	1663.318	2	18.787	.000

a. Asymptotically F distributed.

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Games-Howell

Dependent Variable	(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Interferon Gamma	Kontrol	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	-29.889*	1.359	.000	-33.70	-26.08
		Ekstrak Bawang Putih 20 mg	-59.889*	1.230	.000	-63.33	-56.45
	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	Kontrol	29.889*	1.359	.000	26.08	33.70
		Ekstrak Bawang Putih 20 mg	-30.000*	1.786	.000	-34.61	-25.39
	Ekstrak Bawang Putih 20 mg	Kontrol	59.889*	1.230	.000	56.45	63.33
		Ekstrak Bawang Putih 10 mg	30.000*	1.786	.000	25.39	34.61
Interleukin 2	Kontrol	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	-24.778*	1.372	.000	-28.59	-20.96
		Ekstrak Bawang Putih 20 mg	-43.556*	1.125	.000	-46.65	-40.46
	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	Kontrol	24.778*	1.372	.000	20.96	28.59
		Ekstrak Bawang Putih 20 mg	-18.778*	1.698	.000	-23.18	-14.38
	Ekstrak Bawang Putih 20 mg	Kontrol	43.556*	1.125	.000	40.46	46.65
		Ekstrak Bawang Putih 10 mg	18.778*	1.698	.000	14.38	23.18
NFKB	Kontrol	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	-38.778*	1.201	.000	-42.03	-35.53
		Ekstrak Bawang Putih 20 mg	-72.444*	1.074	.000	-75.32	-69.57
	Ekstrak Bawang Putih 10 mg	Kontrol	38.778*	1.201	.000	35.53	42.03
		Ekstrak Bawang Putih 20 mg	-33.667*	1.465	.000	-37.45	-29.88
	Ekstrak Bawang Putih 20 mg	Kontrol	72.444*	1.074	.000	69.57	75.32
		Ekstrak Bawang Putih 10 mg	33.667*	1.465	.000	29.88	37.45

88