



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**EFEK KURKUMIN TERHADAP PROLIFERASI SEL LIMFOSIT DARI  
LIMPA MENCIT C3H BERTUMOR PAYUDARA SECARA *IN*  
*VITRO***

**TESIS**

**KHAIRINAL  
0806477176**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCASARJANA DEPARTEMEN KIMIA  
UNIVERSITAS INDONESIA  
DEPOK  
2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**EFEK KURKUMIN TERHADAP PROLIFERASI SEL LIMFOSIT DARI  
LIMPA MENCIT C3H BERTUMOR PAYUDARA SECARA *IN*  
*VITRO***

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains**

**KHAIRINAL**

**0806477176**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCASARJANA DEPARTEMEN KIMIA  
UNIVERSITAS INDONESIA**

**DEPOK**

**2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Khairinal  
NPM : 0806477176

Tanda Tangan :   
Tanggal : 13 Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Khairinal  
NPM : 0806477176  
Program Studi : Magister Ilmu Kimia  
Judul Skripsi : Efek Kurkumin Terhadap Proliferasi Sel Limfosit dari Limpa  
Mencit C3H Bertumor Payudara Secara *in Vitro*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing: Dr. Endang Saepudin.

(.....)

Penguji I: Prof.Dr. Sumi Hudyono, PWS

(.....)

Penguji II: Prof.Dr. Soleh Kosela

(.....)

Penguji III : Dr. Herry Cahyana

(.....)

Penguji IV :Dr. Budiawan

(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 13 Januari 2012

## KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur hanya kepada Allah SWT, sholawat dan salam untuk Nabi Muhammada dan keluarganya. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Science Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) DR. Endang Saepudin., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
- (2) Drs. Kusmadi, M.S. dosen pembimbing di lapangan yang telah memberikan masukan serta arahan dalam penyelesaian tesis ini;
- (3) Pimpinan dan staff Patologi Anatomik dan Kimia FK UI yang telah memberikan kesempatan untuk menggunakan semua fasilitas penelitian;
- (4) Pimpinan dan staff LAPTIB puspitek, Serpong yang telah memberikan bantuan analisis kurkumin;
- (5) Kepala Dinas dan kepala UPT BPMHP Dinas Kelautan dan Pertanian DKI Jakarta yang telah memberikan izin mengikuti program pasca sarjana;
- (6) Dosen Pascasarjana, staff, dan karyawan Departemen Kimia FMIPA UI atas bantuan yang diberikan untuk menyelesaikan kuliah ini;
- (7) Sahabat-sahabat yang secara khusus yang telah meluangkan waktu dan tenaga untuk membantu penyelesaian tesis ini: Ibu Wiwik, Pak Slamet, Imam, Dila, Harry, Pak Pras, Hadi, dan Kukuh serta pihak-pihak lainnya yang tak dapat disebutkan satu persatu yang tanpa bantuannya tesis ini sulit untuk diselesaikan;
- (7) Khusus buat istri tercinta terima kasih atas doa yang tulus dan terus menerus.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

**Penulis**

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Khairinal  
NPM : 0806477176  
Program Studi : Magister Ilmu Kimia  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“Efek Kurkumin Terhadap Proliferasi Sel Limfosit dari Limpa Mencit C3H Bertumor Payudara Secara *in Vitro*” beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 13 Januari 2011

Yang menyatakan

  
( Khairinal )

## ABSTRAK

Nama : Khairinal  
Program Studi : Kimia  
Judul : Efek Kurkumin Terhadap Proliferasi Sel Limfosit dari Limpa Mencit C3H Bertumor Payudara secara *in Vitro*

Kurkumin adalah senyawa biokatif yang diisolasi dari *Curcuma xanthorrhiza* telah diketahui mempunyai efek anti-kanker payudara. Perkembangan sel tumor payudara mempunyai hubungan yang erat dengan respon imun yang dimediasi oleh sel limfosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kurkumin terhadap respon imun pada sel limfosit dari limpa mencit C3H bertumor payudara secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Sel limfosit diisolasi dari limpa mencit C3H bertumor payudara setelah 2 minggu transplantasi tumor, kemudian diberi perlakuan kurkumin dan dikultur dalam inkubator pada 37 °C dan CO<sub>2</sub> 5%. Pada penelitian ini perlakuan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu perlakuan P1 dengan dosis kurkumin 5 ppm, perlakuan P2 dengan dosis kurkumin 25 ppm, perlakuan P3 dengan dosis kurkumin 50 ppm, dan perlakuan K tanpa perlakuan kurkumin sebagai kontrol. Respon imun ditentukan berdasarkan proliferasi sel limfosit melalui pengamatan dan penghitungan jumlah sel limfosit selama lima hari yakni hari ke 1, 2, 3, 4, dan 5. Penghitungan jumlah sel limfosit dilakukan dengan metode haemositometer dibawah mikroskop fase kontras. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan sel limfosit dengan kurkumin sampai hari ke 5 menyebabkan penekanan/supresi pada sel limfosit sebesar: perlakuan kurkumin 5 ppm 52%, perlakuan kurkumin 25 ppm 55%, dan perlakuan kurkumin 50 ppm 41%. Hasil analisis statistik dengan uji ANOVA satu arah dan uji *Post Hoc Duncan* menunjukkan tidak ada perbedaan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah sel limfosit dengan perlakuan dosis kurkumin yang berbeda (5,25, dan 50 ppm).

Kata kunci : kurkumin, mencit C3H bertumor payudara, sel limfosit, proliferasi  
xiii + 82 halaman : 23 gambar; 6 tabel  
daftar pustaka : 61 (1966-2011)

## ABSTRACT

Name : Khairinal

Program Study : Chemistry

Title : The Effects of Curcumin on Proliferation of Lymphocyte Cell from The Spleen of Breast Cancer C3H Mice in Vitro

Curcumin is a bioactive compound isolated from *Curcuma xanthorrhiza* having biological activities as anti-breast cancer. The development of tumor cell has a strong relationship with cellular immune response mediated by lymphocyte cell. The aim of this study was to find out the effects of curcumin on proliferation of lymphocyte cells from the spleen of breast cancer C3H mice in vitro. This research applied experimental method by using lymphocyte cell isolated from the spleen of breast cancer C3H mice after two weeks of mammary tumor transplantation. Lymphocyte cells were treated with curcumin then cultured in incubator at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. The treatments divided into 4 groups: P1 was group treated with 5 ppm of curcumin, P2 was group treated with 25 ppm of curcumin, P3 was group treated with 50 ppm of curcumin and K group without curcumin treatment as a negative control. Immune response was determined based on cell proliferation through lymphocyte cell amount counting at day-1, day-2, day-3, day-4, and day-5. The amount of lymphocyte cells were counted using haemocytometer method under contrast phase microscope. The result of this study indicated that curcumin treatment suppressed the proliferation of lymphocyte cell: 52% of lymphocyte suppression for treatment with 5 ppm of curcumin, 55% of lymphocyte suppression for treatment with 25 ppm of curcumin, 41% of lymphocyte suppression for treatment with 50 ppm of curcumin. one way-ANOVA and Post Hoc Duncan test showed that there were not significant differentiation against lymphocyte cell amount with the variety of doses of curcumin (5, 25, 50 ppm).

Keywords : curcumin, breast cancer C3H mice, lymphocyte cell, proliferation

xiii+82 pages : 23 pictures; 6 tables

Bibliography : 61 (1966-2011)



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Hipotesis Penelitian.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kanker .....	5
2.2 Terapi Kanker.....	7
2.3 Kanker Payudara .....	7
2.4 Immunologi Kanker .....	10
2.4.1 Antigen Tumor .....	10
2.4.2 Respon Imun.....	10
2.5 Limpa .....	15
2.6 Sel Limfosit .....	16
2.7 Siklus Sel.....	16
2.8 Pertumbuhan dan Proliferasi Sel .....	20
2.9 Imunomodulator .....	24
2.10 Kurkumin .....	25
2.10.1 Sumber Kurkumin .....	27
2.10.2 Aktivitas Biologi Kurkumin .....	27

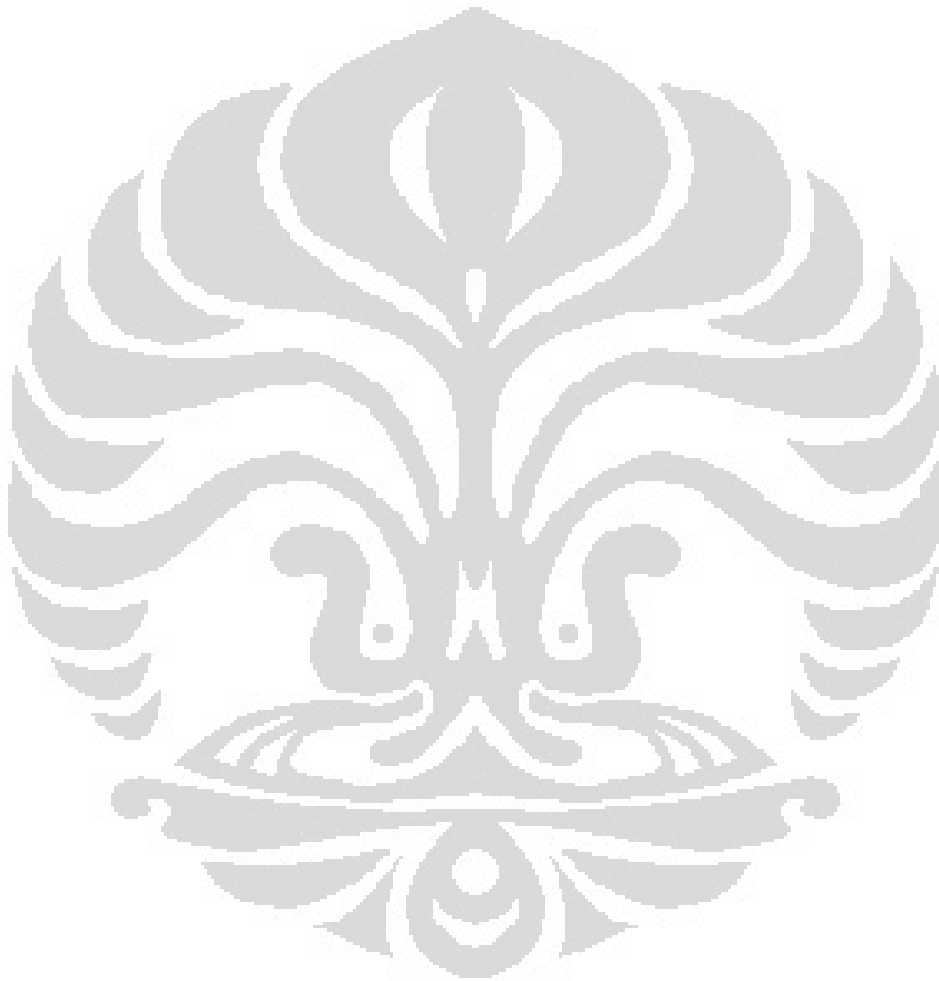
2.11	Kultur Sel .....	29
2.12	Pengujian Proliferasi Limfosit .....	30
2.13	Haemositometer .....	32
2.14	Tumor Kelenjar Susu <i>Transplantable</i> pada Mencit .....	33
<b>III. METODE PENELITIAN</b>		
3.1	Lokasi Penelitian .....	34
3.2	Bahan.....	34
3.3	Alat .....	35
3.4	Analisis Kuantitatif Kurkumin dengan HPLC .....	35
3.5	Sterilisasi Bahan dan Alat .....	36
3.6	Preparasi Medium Kultur .....	36
3.7	Prosedur Transplantasi Tumor .....	36
3.8	Preparasi Suspensi Sel Limfosit.....	37
3.9	Preparasi Larutan Kurkumin .....	37
3.10	Uji Proliferasi Sel Limfosit .....	38
3.11	Analisis Statistik.....	38
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>		
4.1	Analisis Kuantitatif Kurkumin dengan HPLC .....	39
4.2	Transplantasi Tumor .....	40
4.3	Preparasi Suspensi Sel Limfosit .....	42
4.4	Uji Proliferasi Sel Limfosit.....	44
4.5	Pengaruh Dosis Kurkumin Terhadap Proliferasi Sel Limfosit .....	47
4.6	Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Proliferasi Sel Limfosit.....	48
4.7	Analisis Statistik.....	51
4.8	Pembahasan Hasil .....	56
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>		
2.4	Kesimpulan .....	4
2.4	Saran .....	4
<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>		<b>61</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema mekanisme perubahan malignansi pada sel normal .....	6
Gambar 2.2	Diagram sistem imun .....	11
Gambar 2.3	Mekanisme penghancuran sel tumor oleh sistem imun.....	14
Gambar 2.4	Siklus sel .....	17
Gambar 2.5	Mitosis sel.....	20
Gambar 2.6	Pengendalian siklus sel .....	22
Gambar 2.7	Sinyal ekstrinsik untuk pertumbuhan sel.....	22
Gambar 2.8	Sinyal pertumbuhan sel.....	23
Gambar 2.9	Struktur Kurkuminoid.....	26
Gambar 2.10	Dua bentuk tautomer kurkumin: keto dan enol.....	26
Gambar 2.11	Haemositometer .....	32
Gambar 4.1	Mencit strain C3H bertumor payudara .....	41
Gambar 4.2	Limpa mencit strain C3H bertumor payudara.....	42
Gambar 4.3	Sel limfosit mencit strain C3H bertumor payudara .....	43
Gambar 4.4	Penghitungan sel limfosit dengan haemositometer hari ke 1 .....	46
Gambar 4.5	%Persen proliferasi sel limfosit selama 5 hari pengamatan .....	48
Gambar 4.6	Hasil penghitungan %penekanan proliferasi sel limfosit sampai hari ke 5.....	49
Gambar 4.7	Waktu inkubasi sel limfosit dosis 5 ppm.....	50
Gambar 4.8	Waktu inkubasi sel limfosit dosis 25 ppm.....	50
Gambar 4.9	Waktu inkubasi sel limfosit dosis 50 ppm.....	51
Gambar 4.10	Grafik <i>boxplot</i> jumlah sel limfosit .....	53
Gambar 4.11	Pengikatan antigen pada reseptor permukaan sel T.....	57
Gambar 4.12	Pembentukan kompleks IL-2 dengan reseptor IL-2R .....	58

## DAFTAR TABEL

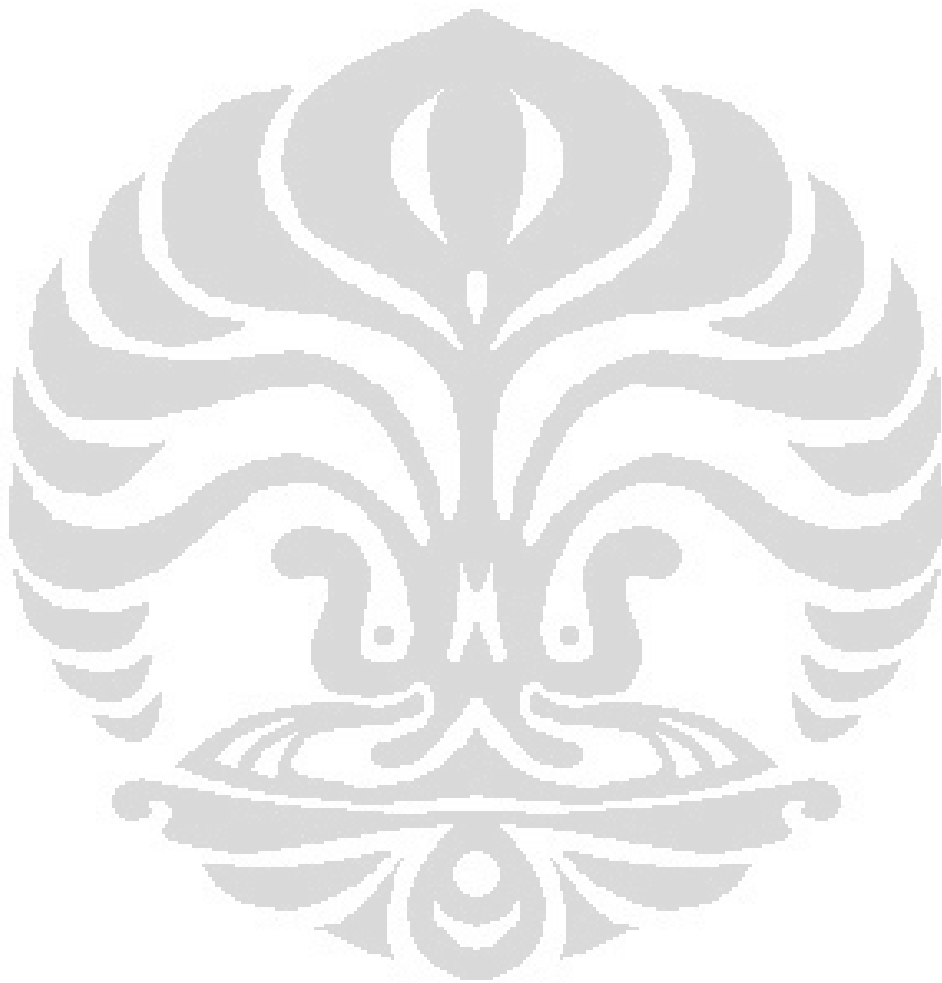
Tabel 4.1	Komposisi senyawa kurkuminoid dalam serbuk kurkumin.....	40
Tabel 4.2	Hasil penghitungan %proliferasi sel limfosit .....	47
Tabel 4.3	Rata-rata jumlah sel limfosit.....	52
Tabel 4.4	Hasil uji normalitas jumlah sel limfosit .....	54
Tabel 4.5	Hasil uji ANOVA satu arah jumlah sel limfosit .....	55
Tabel 4.6	Hasil uji <i>Post Hoc Duncan</i> .....	56



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Kerja .....	66
Lampiran 2. Hasil penghitungan jumlah limfosit .....	67
Lampiran.3. Hasil rata-rata jumlah limfosit .....	77
Lampiran 4. Hasil analisis statistik penghitungan jumlah limfosit.....	78
Lampiran 5. Hasil analisis kuantitatif kapsul kurkumin dengan HPLC.....	80





# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Kanker merupakan penyebab kematian yang cukup tinggi. Di Indonesia, diperkirakan setiap tahun terdapat penderita baru dari setiap seratus ribu penduduk dan penyakit kanker menduduki urutan ketiga penyebab kematian setelah penyakit jantung dan paru-paru (Nugroho, et al., 2000).

Kanker payudara merupakan salah satu kanker yang sering ditemukan di dunia dengan insidensi 20% dari seluruh penyakit kanker. Dari 600.000 kasus kanker payudara baru yang didiagnosis tiap tahun, 350.000 diantaranya ditemukan di negara maju, sedangkan 250.000 lainnya di negara sedang berkembang. Di Indonesia, kanker payudara adalah kanker terbanyak kedua pada wanita setelah kanker leher rahim, bahkan merupakan kanker terbanyak di Padang, Yogyakarta, dan Makasar (Sarjadi & Trihartini, 2001)

Sebagian besar tanaman mengandung ratusan jenis senyawa kimia, baik yang telah diketahui jenis dan khasiatnya ataupun yang belum diketahui jenis dan khasiatnya. Senyawa kimia merupakan salah satu bahan dasar dalam pembuatan obat, dari pelbagai hasil pengkajian menunjukkan bahwa tanaman daerah tropis mempunyai potensi yang cukup besar untuk dikembangkan sebagai obat (Sukara, 2000).

Salah satu sediaan herbal komersial yang banyak beredar di Indonesia ialah sediaan yang berasal dari temulawak dan kunyit. Baik temulawak maupun kunyit memiliki senyawa yang bertanggung jawab terhadap respons biologis berupa zat warna yaitu kurkuminoid. Zat warna kuning ini sering digunakan sebagai bahan tambahan makanan, bumbu, atau obat-obatan dan tidak menunjukkan efek toksik (Meiyanto, 1999). Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa kurkumin aman dan tidak toksik bila dikonsumsi oleh manusia. Jumlah kurkumin yang aman dikonsumsi oleh manusia adalah 100 mg/ hari sedangkan untuk tikus 5 g/hari (Commandeur dan Vermeulen, 1996).

Kurkumin telah diketahui memiliki aktivitas biologis dengan spectrum yang luas. Aktivitas antioksidan ditentukan oleh gugus cincin aromatis. Gugus  $\beta$  diketon dan ikatan rangkap telah dibuktikan berperan pada aktivitas anti kanker dan anti mutagenik kurkumin (Majeed, et al., 1995).

Kurkumin juga telah banyak diteliti aktivitasnya sebagai anti kanker payudara karena mampu menghambat interaksi estrogen dengan reseptornya (Verma et. al, 1998). Dalam penelitian yang lain, dibuktikan bahwa secara in vitro, kurkumin pada sel kanker payudara mampu menghambat Reactive Oxygen Species (ROS) dan jalur c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) yang akan menginduksi terjadinya apoptosis sampai 70 % (Somasundaram et al., 2003). Pebriana, et al. (2008) telah membuktikan secara in silico kurkumin dan senyawa analog kurkumin: PGV-0, PGV-1, HGV-0, dan HGV-1, hasil modifikasi dari kurkumin, memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara.

Pengobatan penderita kanker payudara terkait juga dengan sistem imunitas penderitanya. Sistem imunitas berhubungan erat dengan respon imun yang dimediasi oleh sel limfosit. Sel imun yang berperan penting dalam respon imun sel kanker adalah limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (Natural Killer), dan makrofag (Elemkov, & Chrousos, 1999). Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Sel makrofag menghancurkan sel kanker dengan cara fagositosis. Sedangkan CTL dan sel NK menggunakan mekanisme yang berbeda untuk membunuh sel target yaitu dengan cara mensekresikan perforin dan granzyme serta menggunakan reseptor family TNF (Tumor Nekrosis Factor) seperti Fas, TNF serta TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) untuk menginduksi apoptosis (Lehmann, et al., 2000)

Limfosit sendiri merupakan komponen penting pada sistem imun, baik pada sistem seluler maupun sistem imun humoral. Limfosit merupakan 20% dari semua lekosit dalam sirkulasi darah manusia, terdiri dari sel T dan sel B yang merupakan kunci dalam fungsi kontrol sistem imun (Baratawijaya, 2000). Limfosit memiliki kemampuan untuk membedakan benda asing dari jaringan sendiri, karena memiliki reseptor yang terletak pada permukaan sel (TCR: T Cell Reseptor) (Baratawidjaya, 2000). Limfosit T (sel T) juga berfungsi membantu sel B dalam memproduksi antibodi, mengontrol ambang dan kualitas imun (Baratawidjaya, 2000).

Proliferasi sel limfosit T dirangsang oleh kompleks antigen yang telah diproses oleh makrofag sebagai antigen presenting cells (APC) dan juga diatur oleh pengaruh interleukin-2



(IL-2) terhadap reseptor IL-2 yang dimiliki pada permukaan selnya. Penelitian terbaru menunjukkan proliferasi limfosit T juga dapat terjadi tanpa melalui IL-2, misalnya melalui IL-4. (Baratawidjaja, 2004), Peningkatan proliferasi limfosit ini dapat dipakai sebagai indikator peningkatan aktivitas sistem imun melawan sel kanker.

Selain adanya peran antigen dalam mengaktifkan limfosit T, imunomodulator juga dapat berperan dalam proses ini. Imunomodulator adalah bahan (obat) yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun. Adanya senyawa-senyawa kimia yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun sangat membantu untuk mengatasi penurunan sistem imun dan senyawa-senyawa tersebut dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan. Saat ini terdapat beberapa jenis tumbuhan yang dideteksi berkhasiat sebagai imunomodulator, antara lain : *Echinacea angustifolia*, *Andrographis paniculata*, *Plantago major*, *Allium sativum*, *Zingiber officinalis*, *Curcuma xanthorrhiza* dll. (Mill, 2000; Ebadi, 2002).

Senyawa-senyawa yang mempunyai prospek cukup baik yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun biasanya dari golongan flavonoid, kurkumin, limonoid, vitamin C, vitamin E (tokoferol) dan katekin . Beberapa penelitian menunjukkan kurkumin disamping sebagai senyawa anti kanker juga menunjukkan aktivitas sebagai immunomodulator. Hasil evaluasi pemberian kurkumin harian pada tikus dengan dosis 1, 20 atau 40 mg/kg, setelah 5 minggu menunjukkan dosis tertinggi kurkumin meningkatkan level IgG secara signifikan tetapi aktivitas delayed-type hypersensitivity dan natural killer cell sama dengan nilai kontrol pada semua dosis kurkumin (South, Exon, & Hendrix, 1997). Analisa aktivitas immunomodulator kurkumin pada mencit Balb/c ditemukan peningkatan total WBC (White Blood Cell) secara signifikan pada hari ke 12. Kurkumin juga meningkatkan sirkulasi antibody titre terhadap SRBC (Sheep Red Blood Cell). Kurkumin meningkatkan plaque forming cells (PFC) pada spleen dan jumlah maksimum PFC teramati pada hari ke 6 setelah immunisasi dengan SRBC. Sel Bone marrow cellularity dan alpha-esterase positive juga meningkat oleh kurkumin. Aktivitas fagosit makrofag juga teramati meningkat (Antony, Kuttan, & Kuttan, 1999). Varalakshmi, et al (2008) melalui penelitian in vivo menyatakan bahwa kurkumin dapat memodulasi sistem imun dengan cara meningkatkan kemampuan proliferasi sel T.

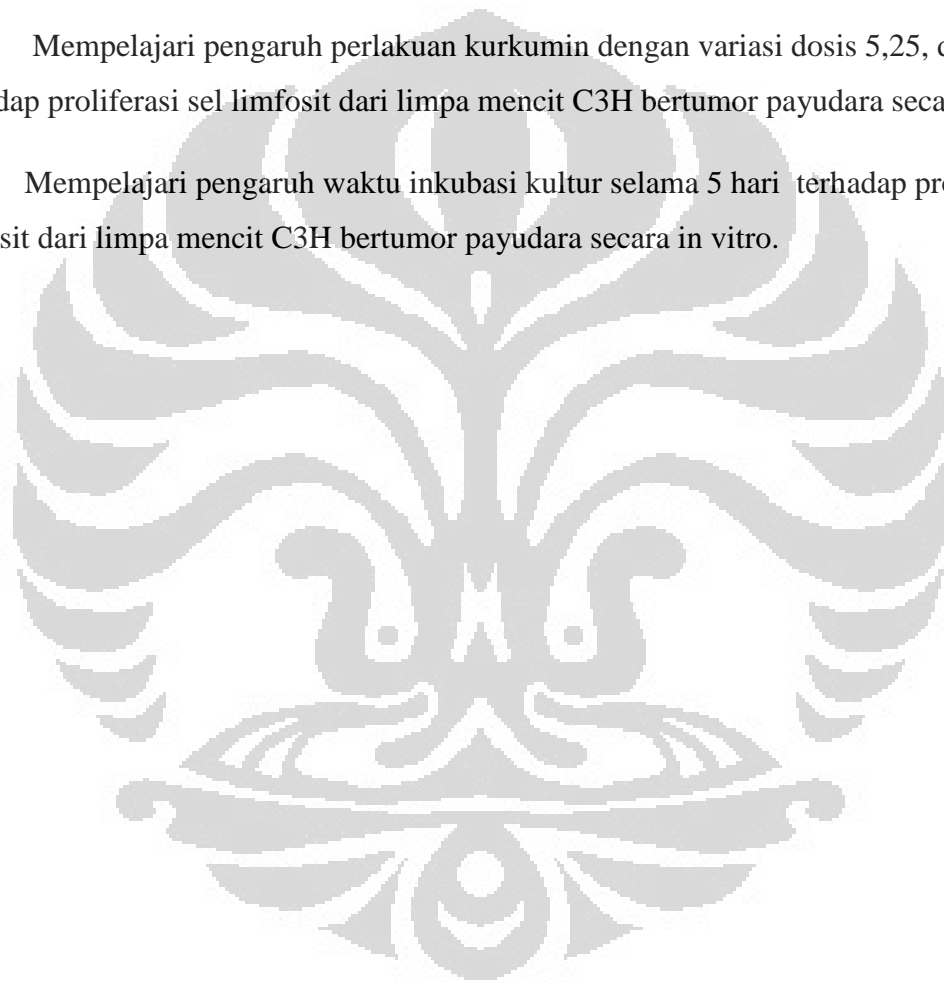
## 1.2 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas perlakuan kurkumin pada sel limfosit akan meningkatkan proliferasi sel limfosit yang berperan penting dalam respon imun melawan sel kanker.

## 1.3 Tujuan Penelitian.

Penelitian yang akan dilakukan bertujuan untuk:

1. Mempelajari pengaruh perlakuan kurkumin dengan variasi dosis 5,25, dan 50 ppm terhadap proliferasi sel limfosit dari limpa mencit C3H bertumor payudara secara in vitro,
2. Mempelajari pengaruh waktu inkubasi kultur selama 5 hari terhadap proliferasi sel limfosit dari limpa mencit C3H bertumor payudara secara in vitro.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker

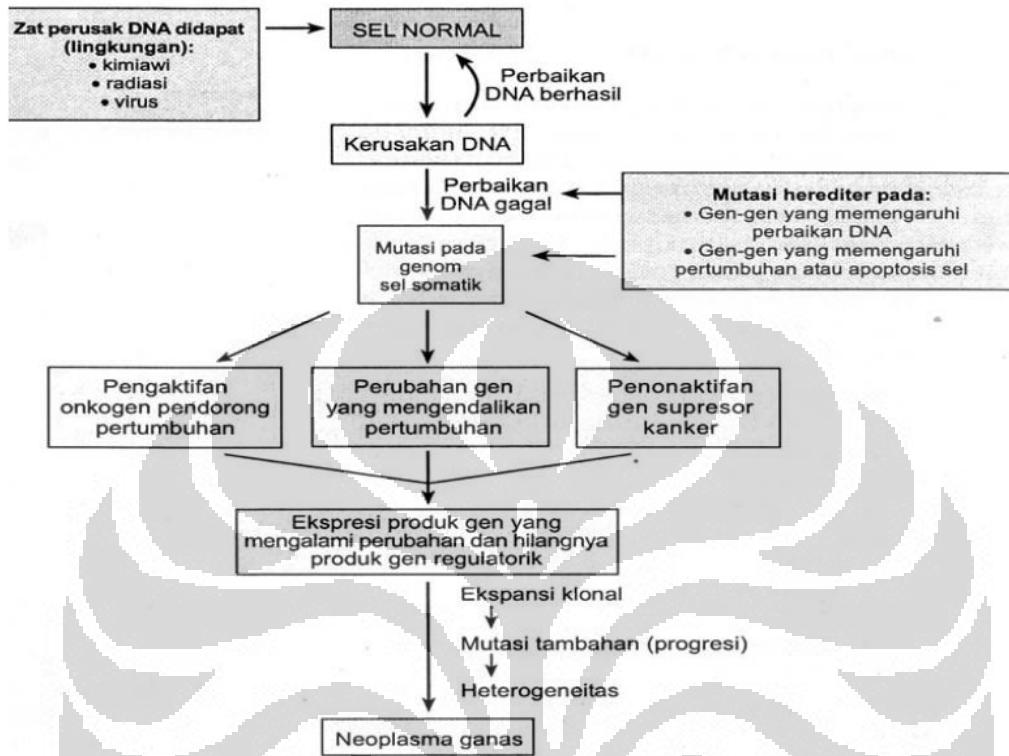
Kanker atau tumor ganas ialah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler (Nafrialdi, & Gan, 2000). Kanker dianggap suatu kelompok penyakit seluler dan genetik karena dimulai dari satu sel yang telah mengalami mutasi DNA sebagai komponen dasar gen. Sel-sel yang mengalami kerusakan genetik itu tidak peka lagi terhadap mekanisme regulasi siklus sel normal sehingga akan terus melakukan proliferasi tanpa kontrol. Mutasi yang terjadi pada DNA di dalam gen yang meregulasi siklus sel (pertumbuhan, kematian, dan pemeliharaan sel) akan menyebabkan penyimpangan siklus sel yang salah satu akibatnya adalah pembentukan kanker atau karsinogenesis.

Kelompok utama gen yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan sel adalah proto onkogen, gen supresor tumor (*tumor suppressor gene* = TSG) dan gen *gatekeeper*. Proto onkogen berperan menstimulasi dan meregulasi pertumbuhan dan pembelahan sel. Gen supresor tumor berfungsi menghambat pertumbuhan sel atau menginduksi apoptosis (kematian sel terprogram). Kelompok gen ini dikenal sebagai anti onkogen karena berfungsi melakukan kontrol negatif (penekanan) pada pertumbuhan sel. Gen supresor tumor yang penting adalah p53 yang mengkode sebuah protein dengan berat molekul 53 kDa. Gen p53 berfungsi mendeteksi kerusakan DNA dan menginduksi reparasi DNA. Gen *gatekeeper* berfungsi mempertahankan integritas genomik dengan mendeteksi kesalahan pada genom dan memperbaikinya (Kintzios dan Barberaki, 2004).

Pada keadaan normal, pertumbuhan sel terjadi sesuai dengan kebutuhan melalui siklus sel normal yang dikendalikan secara terpadu oleh fungsi ketiga gen: proto onkogen, gen supresor tumor dan *gen gatekeeper* secara seimbang. Jika terjadi ketidakseimbangan fungsi ketiga gen ini atau salah satu tidak berfungsi dengan baik karena mutasi maka keadaan ini akan menyebabkan penyimpangan siklus sel.

Proses terbentuknya kanker dapat terjadi melalui tiga cara yaitu : perpendekan waktu siklus sel sehingga akan menghasilkan lebih banyak sel dalam satuan waktu, penurunan jumlah kematian sel akibat gangguan proses apoptosis dan masuknya kembali populasi sel yang tidak aktif berproliferasi ke dalam siklus proliferasi. Misalnya, pada kondisi TSG

kurang aktif atau proto onkogen terlalu aktif. (McKelvey dan Evans, 2003; Gondhowiarjo, 2004; dan Walker dan Blackburn, 2004).



**Gambar 2.1** Skema mekanisme perubahan malignansi pada sel normal.

## 2.2 Terapi Kanker

Pengobatan kanker sendiri ditujukan untuk memusnahkan kanker atau membatasi perkembangan penyakit serta menghilangkan gejala-gejalanya. Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan cara:

a. Pembedahan

Pembedahan ini terutama untuk tumor padat yang terlokalisasi, seperti karsinoma pada payudara dan kolorektal.

b. Radiasi

Radiasi digunakan untuk pengobatan tambahan sesudah pembedahan dan juga untuk pengobatan tumor yang sesuai, seperti seminoma testicular dan karsinoma nasofaring.

c. Kemoterapi

Kemoterapi ini terutama untuk pengobatan tumor yang tidak terlokalisasi seperti leukimia, koriokarsinoma, multiple myeloma, penyakit *Hodgkin*, limfoma *Burkit*, dan juga digunakan untuk pengobatan tambahan setelah pembedahan.

d. Endokrinoterapi

Endokrinoterapi merupakan bagian dari kemoterapi, yaitu penggunaan hormon tertentu untuk pengobatan tumor pada organ yang proliferasinya tergantung pada hormon, seperti karsinoma payudara dan prostat.

e. Imunoterapi

Imunoterapi merupakan teknik pengobatan baru untuk kanker, yang mengerahkan dan lebih mendayagunakan sistem kekebalan tubuh untuk memerangi kanker. Cara imunoterapi ini masih dalam penelitian dan pada masa mendatang kemungkinan berperan penting dalam pencegahan mikrometastasis. (Palupi, 2006)

### 2.3 Kanker Payudara

Kanker payudara (*Carcinoma mammae*) adalah kanker pada jaringan payudara. Kanker payudara merupakan kanker tertua yang ditemukan di dunia. Kanker payudara merupakan salah satu kanker yang sering ditemukan di dunia dengan insidensi 20% dari seluruh penyakit kanker. Dari 600.000 kasus kanker payudara baru yang didiagnosis tiap tahun, 350.000 diantaranya ditemukan di negara maju, sedangkan 250.000 lainnya di negara sedang berkembang. Di Indonesia, kanker payudara adalah kanker terbanyak kedua pada wanita setelah kanker leher rahim, bahkan merupakan kanker terbanyak di Padang, Yogyakarta, dan Makasar (Sarjadi & Trihartini, 2001)

Penyebab pasti kanker payudara tidak diketahui. Meskipun demikian, riset mengidentifikasi sejumlah faktor yang dapat meningkatkan risiko pada individu tertentu, yang meliputi:

a. Faktor genetik

Faktor genetik berpengaruh dalam peningkatan terjadinya kanker payudara (Virginia, 1993). Proto onkogen yang berperan pada terjadinya kanker payudara adalah C-erb-B2 (neu) yang merupakan reseptor faktor pertumbuhan, oleh karena berbagai sebab yang tidak diketahui mengalami amplifikasi dimana pita dari suatu kromosom akan mengalami penggandaan. Bila daerah yang terganggu tersebut merupakan lokasi dari suatu proto onkogen (misalnya C-erb B2), maka proto onkogen tersebut akan ikut terganggu sehingga terjadi ekspresi yang berlebihan.

Kanker payudara dapat terjadi bila suatu anti onkogen yang berfungsi untuk memperbaiki suatu kerusakan DNA, karena suatu mutasi kehilangan fungsinya, maka mutasi gen lain tak dapat dicegah, termasuk mutasi pada gen-gen penyebab kanker. Pada kanker payudara anti onkogen yang berperan adalah BRCA-1 ( pada kromosom 17) dan BRCA-2 (pada kromosom 13) (BRCA= *breast cancer*). Juga pada keadaan mutasi homozigot pada gen p53, apoptosis tak dapat terjadi dan mutasi tak dapat dicegah. Dalam hal ini p53 dengan peran gandanya berfungsi sebagai anti-onkogen yaitu mencegah replikasi sel dengan cara menahan sel tetap berada pada fase G1 (atau G2) dan memacu apoptosis untuk mengeliminasi sel yang mengandung DNA yang rusak. Hilangnya p53 atau mutasi p53 akan menyebabkan hilangnya kendali *check*

*point* ini, sehingga sel-sel dengan kerusakan DNA lolos masuk ke fase S dengan segala akibatnya. Auto antibodi dari p53 telah ditemukan di dalam serum penderita kanker payudara (Stites, Terr, & Parslow, 1997; Robbins, Kumar, & Cotran, 2007).

b. Hormon

Kelebihan hormon estrogen endogen atau lebih tepatnya terjadi ketidakseimbangan hormon terlihat sangat jelas pada kanker payudara (Virginia, et al., 1993). Banyak faktor resiko yang dapat disebutkan seperti masa reproduksi yang lama, nulipara, dan usia tua saat mempunyai anak pertama akan meningkatkan estrogen pada siklus menstruasi (Dickson, & Lippman, 1997). Wanita pasca menopause dengan tumor ovarium fungsional dapat terkena kanker payudara karena adanya hormon estrogen berlebihan (Dickson, & Lippman, 1997). Suatu penelitian menyebutkan bahwa kelebihan jumlah estrogen di air seni, frekuensi ovulasi, dan umur saat menstruasi dihubungkan dengan meningkatnya resiko terkena kanker payudara (Virginia, et al., 1993).

Epitel payudara normal memiliki reseptor estrogen dan progesteron. Kedua reseptor ditemukan pada sebagian besar kanker payudara (Virginia, et al., 1993). Berbagai bentuk *growth promoters* (*transforming growth factor-alpha / epithelial growth factor, platelet-derived growth factor*), *fibroblast growth factor* dan *growth inhibitor* disekresikan oleh sel kanker payudara manusia. Banyak penelitian menyatakan bahwa *growth promoters* terlibat dalam mekanisme *autokrin* dari tumor (Dickson, & Lippman, 1997). Produksi GF (*Growth Factor*) tergantung pada hormon estrogen, sehingga interaksi antara hormon, reseptor hormon di sel kanker dan GF autokrin merangsang sel tumor menjadi lebih progresif (Virginia, et al., 1993).

c. Faktor lingkungan

Pengaruh lingkungan diduga karena berbagai faktor antara lain : alkohol, diet tinggi lemak, kecanduan minum kopi, dan infeksi virus. Hal tersebut mungkin mempengaruhi onkogen dan gen supresi tumor dari kanker payudara (Virginia, et al., 1993).

## 2.4 Imunologi Kanker

### 2.4.1 Antigen Tumor

Antigen tumor merupakan molekul yang terbentuk pada permukaan sel yang berubah ganas. Antigen itu dapat mengaktifkan sistem imun yang spesifik terhadap sel kanker tersebut.

Antigen tumor ini akan diekspresikan ke membran sel bersama *Major Histocompatibility Complex*/ MHC I dan MHC II membentuk MHC-antigen kompleks. Komplek inilah yang akan dikenali oleh sistem imun kita. Antigen dengan MHC klas I akan dikenali oleh *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL). Antigen dengan MHC klas II akan dikenali oleh sel *T helper* (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Roitt, 1991).

### 2.4.2 Respon Imun

Respon imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel imunokompeten, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Secara umum terdapat dua jenis respon imun terhadap kanker yaitu mekanisme humoral dan mekanisme seluler:

#### A. Mekanisme humoral

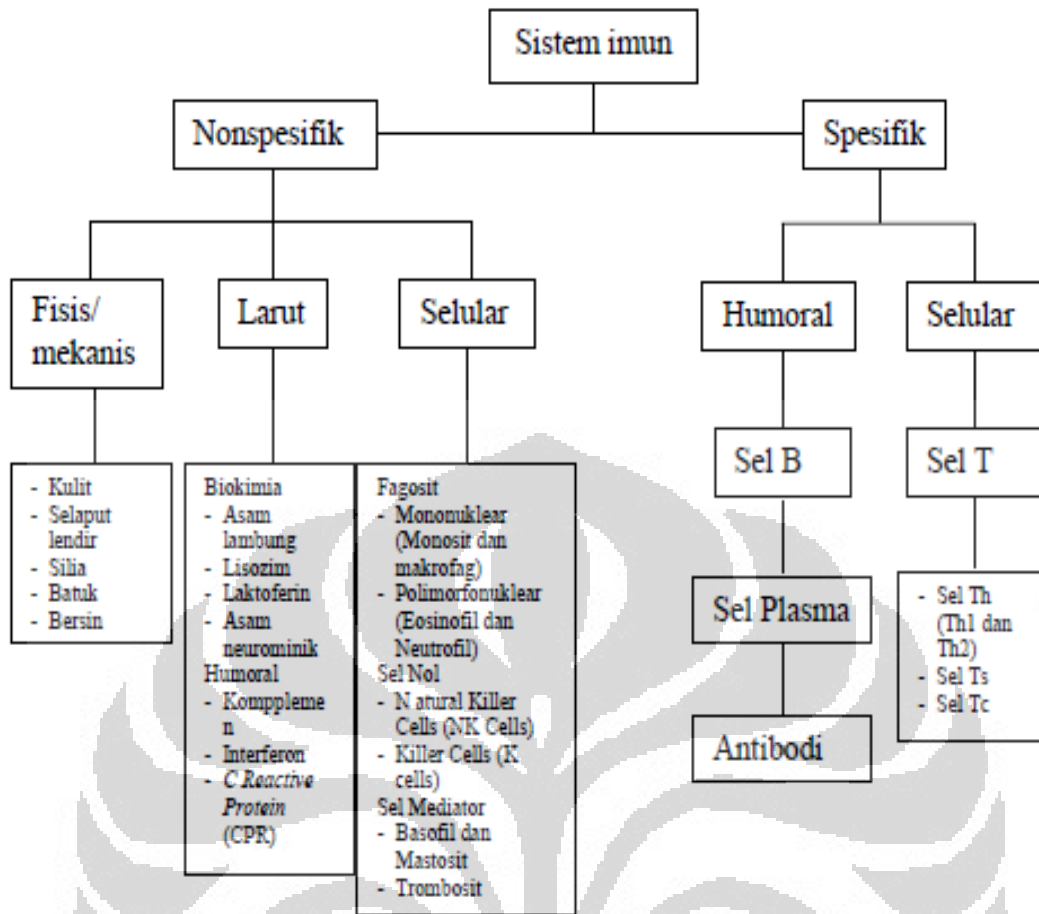
1. Lisis oleh antibodi dan komplemen
2. Oponisasi melalui antibodi dan komplemen
3. Hilangnya adhesi oleh antibody

#### B. Mekanisme seluler

- 1 Destruksi oleh sel CTL / Tc ( sel pembunuh = Tc )
2. Destruksi oleh sel NK (*Natural Killer*)
3. Destruksi oleh makrofag.

Peran imunitas seluler pada kanker lebih dominan dibandingkan imunitas humoral . (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Roitt, 1991).





**Gambar 2.2** Diagram Sistem Imun)

### Limfosit T Sitotoksik / CTL

Limfosit T timbul dari sel induk di dalam sumsum tulang yang bermigrasi ke timus. Kemudian sel induk berdiferensiasi menjadi sel T dewasa dan meninggalkan timus. Sel T matur ikut aliran darah, aliran limfe dan jaringan limfoid perifer. Sel T hanya mampu mengenali antigen suatu sel dalam bentuk peptida. CTL/Th1 dapat dikenali dengan penggunaan marker  $CD8^+$ , sedangkan Th2 dapat dikenali dengan penggunaan marker  $CD4^+$ .

Sel Th2 akan mengeluarkan *Interferon- $\gamma$*  (IFN  $\gamma$ ) dan *Tumor Nekrosis Factor* (TNF)  $\alpha$ . IFN  $\gamma$  dapat meningkatkan fagositosis makrofag dan CTL, TNF  $\alpha$  mampu meningkatkan kemotaksis sehingga timbul inflamasi. Sel Th2 juga mengeluarkan *interleukin-4* (IL-4) untuk meningkatkan proliferasi sel B sehingga mampu memproduksi *antibodi* (Ab). Dalam hal ini fungsi Ab adalah untuk opsonisasi sel kanker sehingga mudah dikenali oleh sel imun dan

mengaktifkan sistem komplemen. IL- 2 diproduksi oleh sel imun dan diperlukan untuk mengaktifkan sel imun sendiri. (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Roitt, 1991).

Banyak studi menunjukkan bahwa kanker mengekspresikan antigen spesifik yang dapat memacu CTL sehingga dapat menghancurkan sel kanker. Untuk ketahanan terhadap tumor peran CTL sangat penting, disatu pihak karena mereka sangat kuat daya kerjanya (satu CTL dalam binatang percobaan in vivo dapat membinasakan kira kira 1000 sel tumor ) di lain pihak karena molekul MHC I terdapat hampir pada semua sel berinti, termasuk tumor-tumor (Tonini, et al.,1998)

CTL melaksanakan tugas menghancurkan sel kanker dengan cara :

1. Mengeluarkan perforin dan granzim yang menyebabkan sel kanker lisis.
2. Mengeluarkan IFN  $\gamma$  sehingga meningkatkan kerja fagositosis makrofag.
3. Dengan perantara FasL, CTL melakukan recognition terhadap sel kanker yang telah diopsonisasi sehingga mengakibatkan apoptosis sel kanker. (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Roitt, 1991).

### Sel NK

Sel NK berukuran sedikit lebih besar daripada sel limfosit kecil, berjumlah 10-15% limfosit darah perifer. Secara morfologi sel NK termasuk dalam populasi *Large Granular Lymphocyte* (LGL), yang mengandung granula sitotoksik dari sitoplasma. Sel NK dapat berperan dalam respon imun spesifik maupun non spesifik. Sel NK merupakan sel efektor terhadap sitotoksitas spontan berbagai jenis sasaran, tidak memiliki sifat klasik dari makrofag, granulosit maupun CTL dan sitotoksitasnya tidak tergantung pada MHC. Mekanisme yang digunakan sel NK dalam membunuh sel kanker serupa dengan yang dilakukan oleh CTL yaitu dengan melisis dan apoptosis sel kanker. (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Roitt, 1991; Whiteside, & Haberman, 1990).

Sel NK tidak mempunyai TCR dan merupakan CD3 negatif. Sel NK mempunyai 2 tipe reseptor yaitu yang berkaitan dengan aktivasi sel NK dan *killer inhibitor reseptor* (KIR) yang menghambat sitolisis NK melalui pengenalan terhadap molekul MHC I-nya sendiri. Sel NK tidak melisis sel berinti yang sehat karena semuanya mengeluarkan MHC I. Jika infeksi virus dan atau perubahan neoplastik mengurangi pengeluaran MHC I normal, sinyal KIR akan terganggu dan terjadilah lisis. (Robbins, Kumar, & Cotran, 2007).

Sel NK juga mengekspresikan CD56 yaitu suatu molekul yang mampu mempromosikan adhesi intraseluler. Sel NK mempunyai reseptor untuk bagian tetap ( Fc $\gamma$  RIII atau CD 16) dari *Imunoglobulin G* (IgG) yang menjadikan

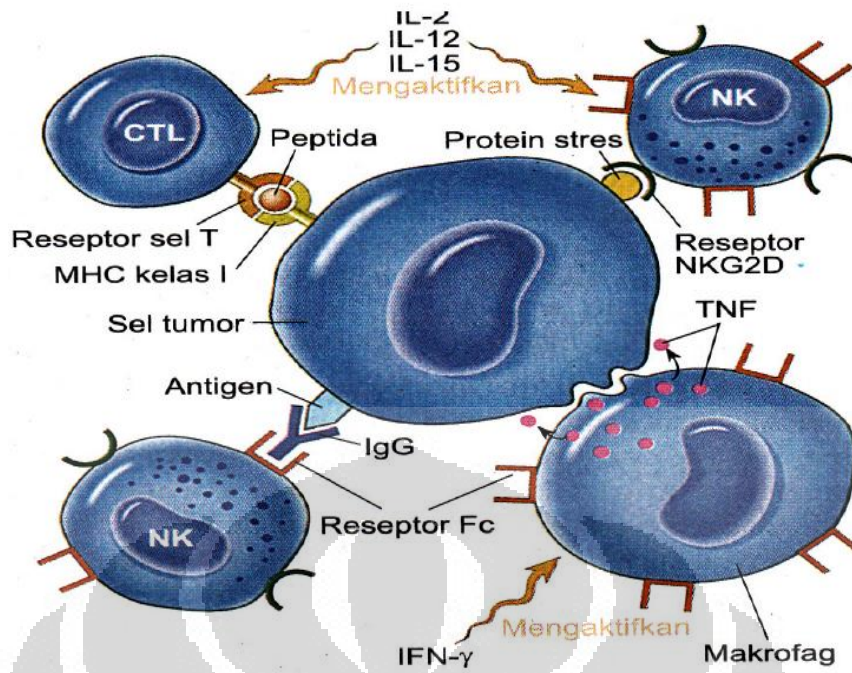
sitotoksitasnya tergantung antibodi, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC). Antigen yang diopsonisasi oleh Ig G akan dikenali oleh sel NK untuk dilisiskan. Aktivitas ADCC ini penting untuk efek terapeutik optimal dari antibody monoklonal tumor spesifik (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Roitt, 1991; Whiteside, & Haberman, 1990).

Kemampuan sel ditingkatkan oleh IFN, TNF, IL 2, IL-12, sehingga peran anti tumor sel NK bergantung pada rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut. IFN mengubah sel pre-NK menjadi sel NK (Tonini, et al, 1998). Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis karena sel NK mempunyai peran penting dalam mencegah metastasis dengan mengeliminasi sel tumor dalam sirkulasi. Hal ini dibuktikan dengan adanya penelitian yang mengungkapkan bahwa 90 % - 99 % sel tumor yang dimasukkan intravena akan hilang dalam 24 jam pertama yang berhubungan secara bermakna dengan jumlah dan aktivitas sel NK. Percobaan menggunakan sel NK yang diaktivasi dengan *cyclophosphamid* menunjukkan bahwa sel NK gagal mencegah metastasis. (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Whiteside, & Haberman, 1990).

### **Makrofag**

Makrofag dapat berperan dalam melawan sel tumor dengan berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC), menghasilkan sitokin yang mengaktifkan sel imunitas lain dan bertindak sebagai efektor langsung dengan melisis sel tumor apabila sudah diaktivasi oleh *Makrofag Activating Factor* (MAF).

Kemampuannya berikatan dengan sel tumor karena makrofag juga mempunyai reseptor Fc yang mampu bekerjasama dengan IgG. Penyebab sel tumor lisis akibat reaksi enzim lisosom, metabolit reaktif terhadap oksigen dan *nitrit oxide* (NO). Makrofag juga aktif mensekresi TNF yang mampu melisis sel tumor dengan cara berikatan dengan reseptor permukaan sel tumor dan menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh. Diakhir peristiwa imunitas dihasilkan debris-debris sisa penghancuran sel, disini peran makrofag sebagai petugas kebersihan yang membersihkan debris tersebut. Opsonisasi komplemen dan antibodi terhadap debris-debris tersebut membantu proses fungsi pembersihan makrofag. Bila fungsi makrofag terganggu maka kompleks Ag-Ab akan menyebabkan reaksi hipersensitivitas ataupun autoimun. (Abbas, Lichtman, & Pober, 1991; Roitt, 1991; Whiteside, & Haberman, 1990).



**Gambar 2.3** Mekanisme penghancuran sel tumor oleh sistem imun.

## 2.5 Limpa

Limpa adalah kelenjar tanpa saluran (*ductless*) yang berhubungan erat dengan sistem sirkulasi dan berfungsi menghancurkan sel darah merah tua. Limpa termasuk salah satu organ sistem limfoid, selain timus, tonsil, dan kelenjar *limfe* (Aughey, & Frye, 2001).

Limpa adalah salah satu organ yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Limpa merupakan kumpulan jaringan limfoid terbesar dalam organisme. Pada orang dewasa normal, berat limpa kurang lebih 150 gram dan panjang 11 sentimeter.

Secara anatomis, tepi limpa yang normal berbentuk pipih. Limpa tampak merah-ungu karena kandungan darahnya. Terletak di abdomen kiri-atas, mempunyai konsistensi lunak, dan sebagian besar permukaannya terasa licin. Limpa dibungkus oleh kapsula, yang terdiri atas dua lapisan, yaitu satu lapisan jaringan penyokong yang tebal dan satu lapisan otot halus. Limpa terdiri atas pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa limpa ini menempati ruang antara trabekula dan simpai pembungkus limpa. Pulpa putih terdiri atas jaringan limfoid yang menyelubungi arteri sentralis dan nodulus limfatikus yang ditambahkan pada selubung. Sel-

sel limfoid yang mengelilingi arteri sentralis terutama adalah limfosit T. Nodus limfatikus terutama terdiri dari limfosit B.

Fungsi limpa yaitu mengakumulasi limfosit dan makrofag, degradasi eritrosit, tempat cadangan darah, dan sebagai organ pertahanan terhadap infeksi partikel asing yang masuk ke dalam darah. Dalam melakukan fungsi tersebut, limpa menghasilkan antibodi humoral terhadap antigen yang diangkut melalui darah. Selain itu, organ ini memiliki banyak makrofag yang berperan dalam destruksi sel darah merah yang sudah rusak. Makrofag juga bertugas melenyapkan debris yang beredar dan setiap bahan renik yang mungkin terdapat dalam darah. (Khasanah, N., 2009)

Limpa merupakan salah satu organ yang bertanggung jawab terhadap pemenuhan kebutuhan limfosit khususnya dalam proliferasi dan diferensiasi limfosit T. (Junqueira, Carneiro, & Kelley, 1997)

## **2.6 Sel Limfosit**

Sel limfosit merupakan sel dengan inti yang besar dan bulat serta memiliki sedikit plasma. Telah dihitung bahwa pada manusia sekitar  $3.5 \times 10^{10}$  limfosit setiap hari masuk dalam sirkulasi darah. Ukuran bervariasi dari 7 sampai dengan 15 mikron. Banyaknya 20-25% dari semua leukosit dalam sirkulasi darah manusia, terdiri dari sel T dan sel B (Baratawidjaja, K., 2004)

Sel limfosit mampu bertahan hidup selama bertahun-tahun. Sel limfosit merupakan respon imun spesifik yang terdiri dari respon humoral dan seluler. Respon humoral dilakukan oleh sel limfosit B, dimana sel ini menghasilkan antibodi sebagai respon imunnya, sedangkan respon imun seluler dilakukan oleh sel limfosit T, dimana sel ini menghasilkan limfokinase yang dapat menolak keberadaan benda asing (Holan, V., Nakamura, S., & Minowada, J., 1991)

Proliferasi limfosit merupakan penanda adanya fase aktivasi dari respon imun tubuh. Proliferasi limfosit ini berupa peningkatan produksi limfoblas yang kemudian akan menjadi limfosit. Secara makroskopis dapat terlihat pembesaran organ-organ limfoid (Khasanah, N., 2009). Limpa menjadi lunak dan membengkak akibat proliferasi limfosit di pulpa merah serta infiltrasi neutrofil dan makrofag ke dalam limpa. Aktivasi limfosit limpa disebabkan oleh respon imun dan peran makrofag serta sel NK.

Proliferasi limfosit T dirangsang oleh kompleks antigen, terutama diatur oleh pengaruh IL-2 terhadap reseptor IL-2 yang dimiliki pada permukaan selnya. Penelitian

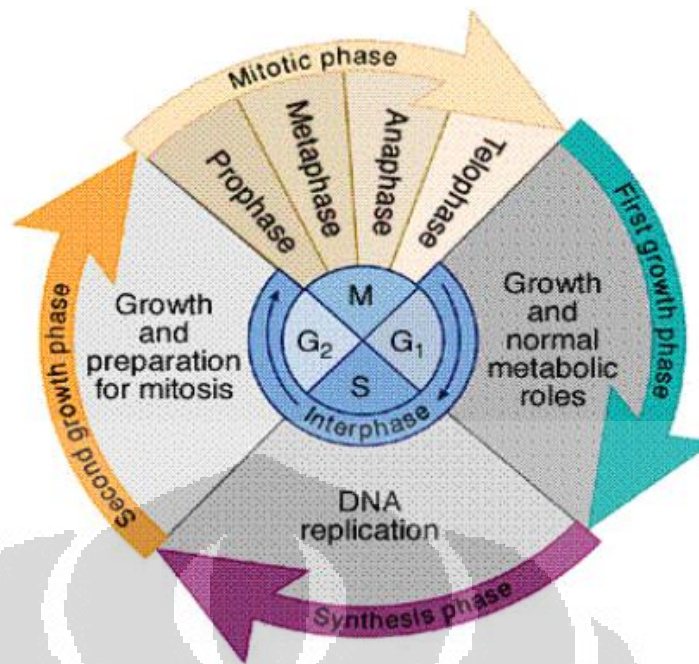
terbaru menunjukkan proliferasi limfosit T juga dapat terjadi tanpa melalui IL-2, misalnya melalui IL-4. (Baratawidjaja, K., 2004)

## 2.7 Siklus Sel

Siklus sel adalah perkembangan perubahan selular yang teratur sampai memasuki tahap pembelahan sel. Siklus sel terdiri dari:

1. Fase G1 (Gap 1), merupakan fase terpanjang setelah mengalami mitosis -dan persiapan sel untuk sintesis DNA. Sel tumbuh membesar dan berfungsi normal dan sebagai kontrol mitosis selanjutnya.
2. Fase S (Sintesis) merupakan fase replikasi DNA sehingga terbentuk 2 kromatid yang identik. Di fase ini terdapat 2 fase penting yaitu transkripsi dan translasi
3. Fase G2 (Gap2) antara fase S dan Mitosis. Persiapan mitosis, fase ini lebih pendek dibanding G1. Pada saat ini sentriol/sentrosom mengalami duplikasi. Pada saat ini sel mengecek hasil sintesis potein yang telah dibuat pada fase sintesis. Bila ada kerusakan DNA maka akan diperbaiki oleh gen DNA polimerase atau diprogram apoptosis.
4. Fase mitosis. Fase ini juga terdiri dari 4 fase, yaitu fase profase, metafase, anafase dan telofase.
5. Fase sintesis, fase G1 dan fase G2 disebut fase interfase yang merupakan 90% dari siklus sel.

(Beeker, 1986).



Gambar 2.4 Siklus sel .

### PROFASE

DNA bersama dengan protein pendukungnya mengubah bentuk DNA untai panjang menjadi bentuk yang terkondensasi seperti bentuk X. Kromatid mengalami kondensasi menjadi lebih pendek dan lebih padat sehingga terbentuk kromosom. Sentrosom yang telah menduplikasi, mulai memproduksi mikrotubulus. Mikrotubulus terus diproduksi ke segala arah, sebagian mikrotubulus dari kutub yang berlawanan bertemu dan berikatan dan mendorong sentrosom bergerak ke kutub sel. Kromosom terus mengalami kondensasi. Membran nukleus menghilang, pecah menjadi fragmen kecil sehingga kromosom terungkap di dalam sitoplasma setelah itu nukleolus menghilang. Setiap kromosom membentuk kinetokor pada setiap sisi sentromer. Sentromer merupakan kompleks protein, tempat melekatnya mikrotubulus pada kromosom. Kinetokor memiliki molekular motor yang menggunakan ATP untuk menarik mikrotubulus. Mikrotubulus terus memanjang sehingga ujung mikrotubulus bertemu dengan mikrotubulus dari kutub lain menjadi mikrotubulus polar membentuk *mitotic spindle*. Mikrotubulus yang menempel pada kinetokor disebut mikrotubulus kinetokor.

## **METAFASE**

Kromosom akan berjajar di garis tengah gelondong (*equatorial plane*), mikrotubulus kinetokor saling tarik menarik. Setiap kinetokor harus berhubungan dengan mikrotubulus. Bila ada yang terlewat, kinetokor akan memberikan sinyal sehingga proses mitosis tidak berlanjut ke tahap selanjutnya (*mitotic spindle check point*).

## **ANAFASE**

Pada fase ini terjadi 2 peristiwa:

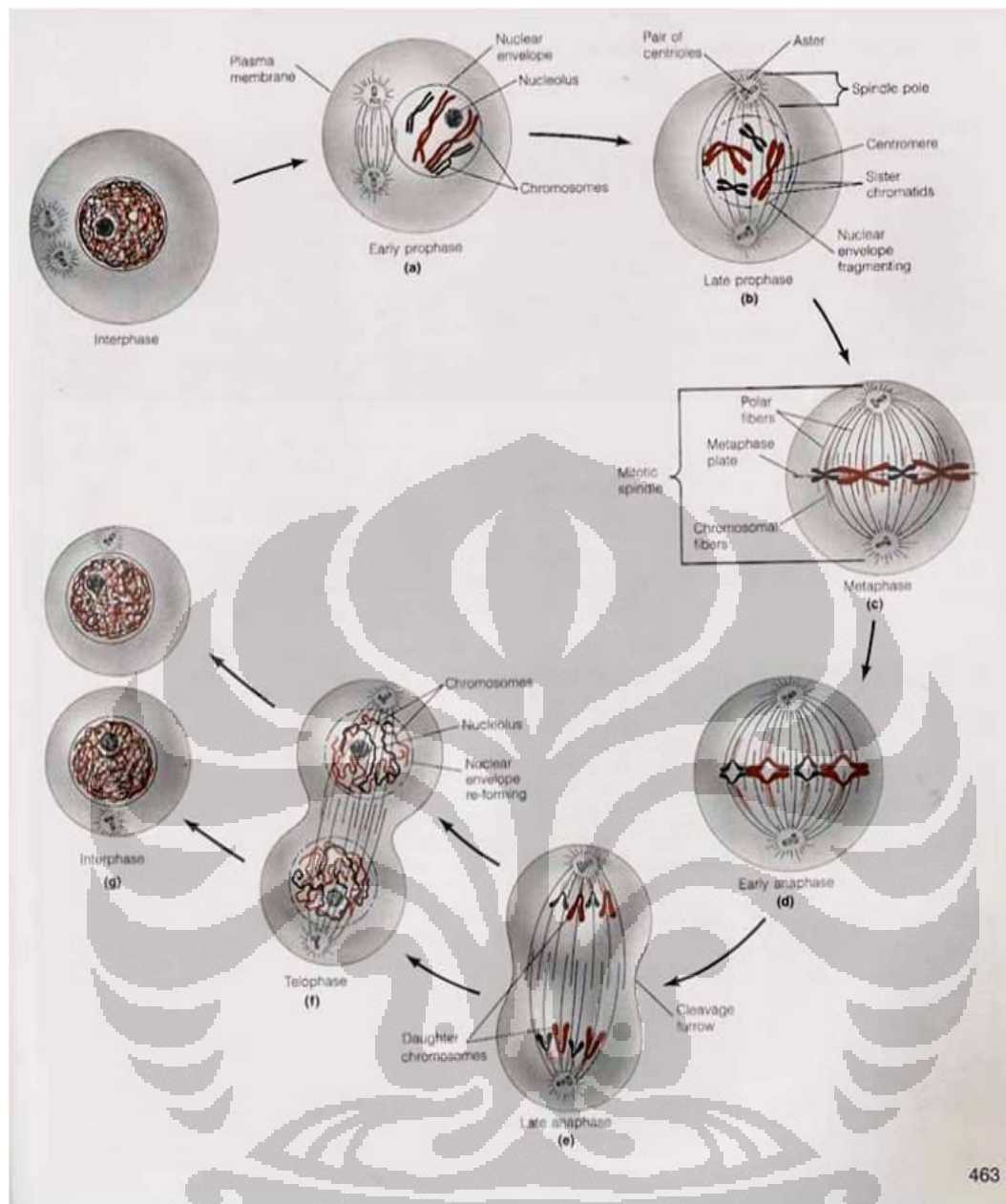
1. Protein yang mengikat 2 kromatid terputus.
2. Mikrotubulus kinetokor memendek menarik kromatid ke arah kutub sel.

Mikrotubulus polar terus memanjang untuk persiapan sitokinesis. Pada akhir anafase terjadi peristiwa sitokinesis yaitu : akhir dari mitosis dimana terjadi pembagian sitoplasma dan mulai terbentuk *cleavage furrow* ditempat *metaphase plate* akibat pengerutan ring yang terbentuk oleh filamen aktin dan miosin. *Cleavage furrow* semakin jelas sampai kedua sitoplasma dan sel terbagi sempurna.

## **TELOFASE**

Pada fase ini mikrotubulus kinetokor menghilang, mikrotubulus polar terus memanjang untuk persiapan sitokinesis. Kromosom mencapai kutub sel kemudian mulai membentuk membran inti dengan menggunakan fragmen membran inti sel induk yang kemudian menyelubungi kromosom. Selanjutnya muncul nukleolus dan kromosom mengalami penguraian. (Becker, 1986; Raven, & Johnson, 1986; Kleinsmith, & Kish, 1988)





Gambar 2.5 Mitosis sel

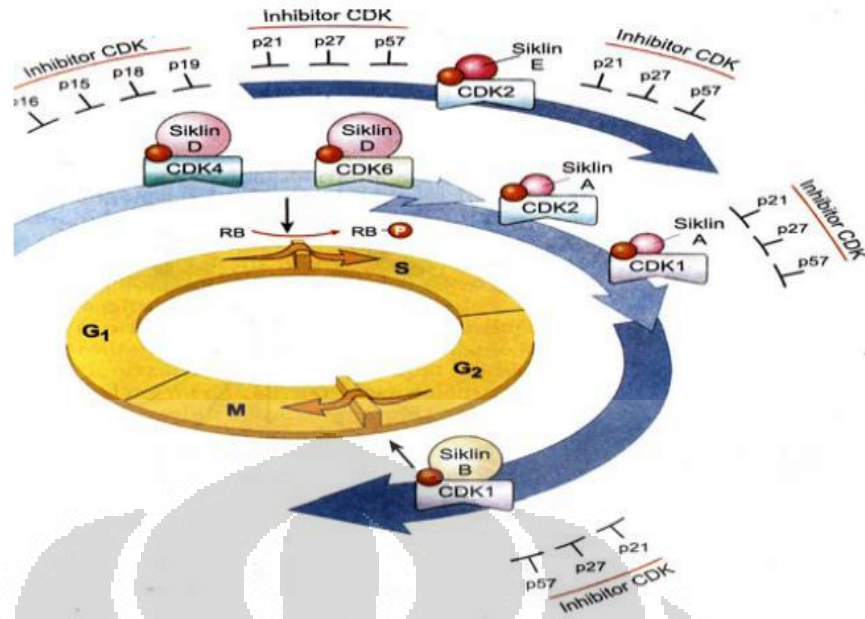
## 2.8 Pertumbuhan dan Proliferasi Sel

Proliferasi sel dapat dirangsang oleh faktor pertumbuhan intrinsik, jejas, kematian sel, bahkan dapat pula oleh deformasi mekanis jaringan. Mediator kimiawi yang terdapat pada lingkungan mikro setempat dapat menghambat atau merangsang pertumbuhan sel. Kendali pertumbuhan yang terpenting adalah penginduksian sel istirahat (*resting cell*) pada fase  $G_0$  ke siklus sel (Robbins, Kumar, & Cotran, 2007; Sarjadi, 2000).

Masuk dan berkembangnya siklus sel dikendalikan melalui perubahan kadar dan aktivitas suatu kelompok protein yang disebut siklin. Pada tahapan tertentu siklus sel, siklin meningkat kemudian didegradasi dengan cepat saat sel bergerak melalui siklus tersebut. Siklin menjalankan fungsi regulasinya melalui pembentukan kompleks dengan suatu protein yang disintesis secara konstitutif yaitu *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). Kombinasi yang berlainan antara siklin dan CDK berkaitan dengan setiap transisi penting dalam siklus sel dan kombinasi ini menggunakan efeknya dengan memfosforilasi sekelompok substrat terpilih (fosforilat kinase dan defosforilat kinase). Fosforilasi dapat menimbulkan perubahan konformasi bergantung pada proteinnya yang secara potensial dapat:

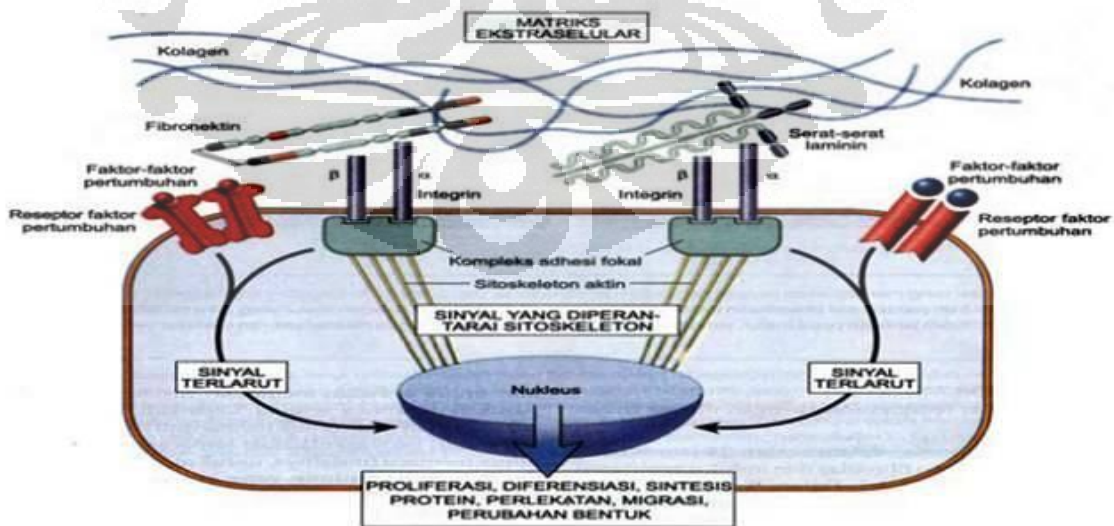
- Mengaktivasi atau menginaktivasi satu aktivitas enzimatik
- Menginduksi atau mengganggu interaksi protein
- Menginduksi atau menghambat pengikatan protein pada DNA
- Menginduksi atau mencegah katabolisme protein

Selain dari sintesis dan pemecahan siklin, kompleks CDK juga diatur melalui pengikatan inhibitor CDK yang terdiri dari 2 famili yaitu CDKI yang punya 3 protein yang menghambat CDK secara luas (p21,p27,p57) dan INK4 yang secara selektif menghambat CDK4 dan CDK6 (p15,p16,p18 dan p19). Komplek ini sangat penting dalam mengatur tahapan siklus sel ( $G1 \rightarrow S$  dan  $G2 \rightarrow M$ ) yaitu tahapan saat sel memastikan bahwa DNA sudah terreplikasi dengan benar dan atau kesalahan sudah diperbaiki. Kegagalan pemantauan secara memadai terhadap keakuratan replikasi DNA akan menyebabkan akumulasi mutasi dan transformasi yang mungkin ganas (Robbins, Kumar, & Cotran, 2007; Sarjadi, 2000; Beeker, 1986).



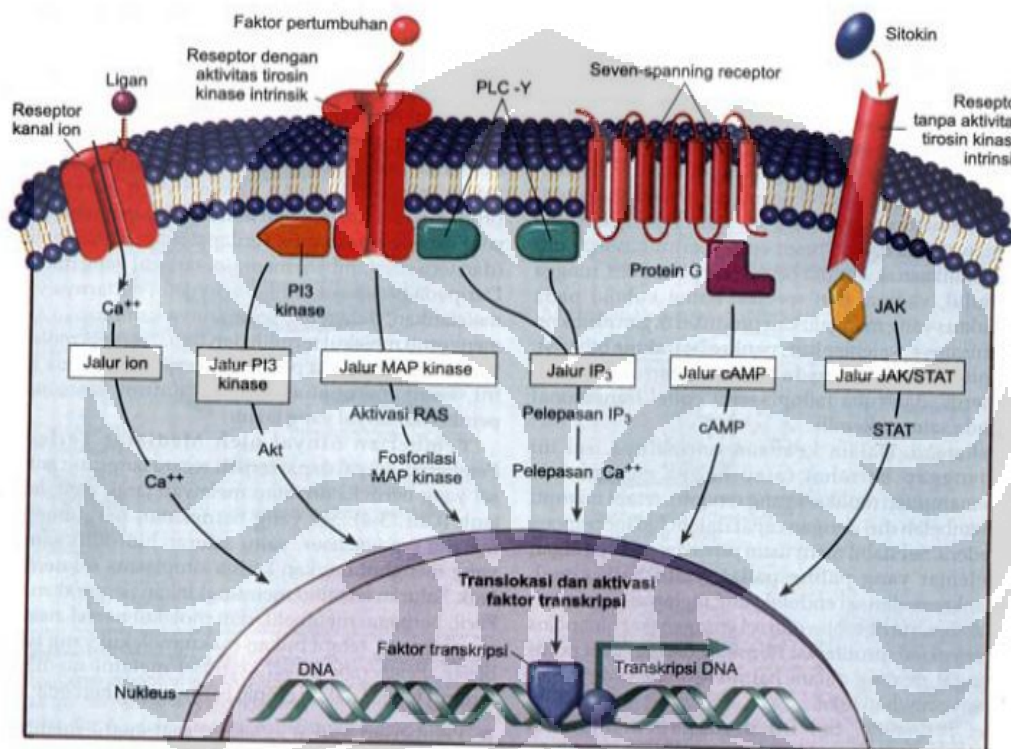
Gambar 2.6 Pengendalian siklus sel.

Pertumbuhan dan differensiasi sel juga dipengaruhi oleh sinyal ekstra sel dan matrik ekstra seluler. Mediator kimiawi yang mempengaruhi pertumbuhan adalah factor pertumbuhan polipeptida yang beredar didalam serum atau diproduksi secara lokal oleh sel. Pemberian sinyal dapat terjadi secara langsung antara sel yang berdekatan atau melalui jarak yang jauh (Robbins, Kumar, & Cotran, 2007)



Gambar 2.7 Sinyal ekstrinsik untuk pertumbuhan sel

Untuk reseptor intrasel, pengikatan ligan mengakibatkan pembentukan kompleks reseptor-ligan yang langsung berhubungan dengan DNA inti sel dan selanjutnya mengaktifkan atau menghentikan transkripsi. Untuk reseptor permukaan sel, pengikatan ligan menghasilkan suatu kaskade peristiwa intrasel sekunder yang diawali dengan kenaikan Ca intrasel atau AMP siklik atau inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) atau aktivasi kinase (Robbins, Kumar, & Cotran, 2007)



**Gambar 2.8** Sinyal pertumbuhan sel

Sinyal penghambat pertumbuhan pada kenyataannya penting dalam pengendalian pertumbuhan sel. Faktor pertumbuhan  $\beta$  yang bertransformasi, TGF  $\beta$  (*tumor growth factor  $\beta$* ), reseptornya mempunyai aktivitas kinase intrinsik dan jika membentuk kompleks dengan TGF  $\beta$  akan memfosforilasi protein intrasel spesifik yang kemudian meningkatkan sintesis inhibitor CDK dan memblok aktivitas faktor transkripsi.

Sebagai contoh DNA yang mengalami radiasi, maka protein supresor gen TP53 akan distabilkan dan menginduksi transkripsi CDKN1A (p21). Inhibitor ini menahan sel pada fase G1 atau G2 untuk memperbaiki DNA, bila telah selesai maka TP53 akan turun dan

CDKN1A berkurang maka sel dapat melanjutkan ke fase berikutnya. Bila kerusakan terlalu luas maka TP53 akan meyakinkan sel untuk bunuh diri (apoptosis).

Pertumbuhan dan differensiasi sel setidaknya melibatkan dua jenis sinyal yang bekerja secara bersamaan. Sinyal pertama berasal dari molekul terlarut, seperti factor pertumbuhan dan penghambat pertumbuhan polipeptida. Sinyal yang kedua melibatkan unsur tidak terlarut pada ekstra seluler matrik yang berintegrasi dengan integrin sel. (Robbins, Kumar, & Cotran, 2007; Sarjadi, 2000; Kleinsmith, & Kish, 1988)

## 2.9 Imunomodulator

Imunomodulator adalah bahan (obat) yang dapat mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun. Cara kerja imunomodulator meliputi :

- 1) mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu (imunrestorasi),
- 2) memperbaiki fungsi sistem imun (imunostimulasi),
- 3) menekan respons imun (imunosupresi).

Dikenal dua golongan imunostimulan yaitu imunostimulan biologi dan sintetik. Beberapa contoh imunostimulan biologi adalah sitokin, antibodi monoklonal, jamur dan tanaman obat (herbal). Sedangkan imunostimulan sintetik yaitu levamisol, isoprinosin dan muramil peptidase (Djauzi, 2003).

Adanya senyawa-senyawa kimia yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun sangat membantu untuk mengatasi penurunan sistem imun dan senyawa-senyawa tersebut dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan. Saat ini terdapat beberapa jenis tumbuhan yang dideteksi berkhasiat sebagai imunomodulator, antara lain : *Echinacea angustifolia*, *Andrographis paniculata*, *Plantago major*, *Allium sativum*, *Zingiber officinalis*, *Curcuma xanthorrhiza* dll. (Mill, 2000; Ebadi, 2002).

Senyawa-senyawa yang mempunyai prospek cukup baik yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun biasanya dari golongan flavonoid, kurkumin, limonoid, vitamin C, vitamin E (tokoferol) dan katekin. Hasil test se-cara *in vitro* dari flavonoid golongan flavones dan flavonols telah menunjukkan adanya respon imun (Hollman *et al.*, 1996). Sedangkan senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai imunostimulan agent adalah golongan senyawa polisakarida, terpenoids, alkaloid dan polifenol (Wagner, 1985).

## 2.10 Kurkumin

Kurkumin tergolong senyawa polifenol dengan massa molar 368,38 g/mol dan rumus molekulnya  $C_{21}H_{20}O_6$ , memiliki nama IUPAC (*1E,6E*)-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione. Pertama kali kurkumin ditemukan pada tahun 1815 oleh Vogel dan Pelletier (van der Goot, 1997). Kristalisasi kurkumin pertama kali dilakukan oleh Daube (1870) dan elusidasi struktur kimia dilakukan pada tahun 1910 oleh Lampe. Sintesis kurkumin dilakukan pada tahun 1913 oleh Lampe dan Milobedzka (Aggarwal *et al.*, 2003).

Sifat kimia dan fisika Kurkumin :

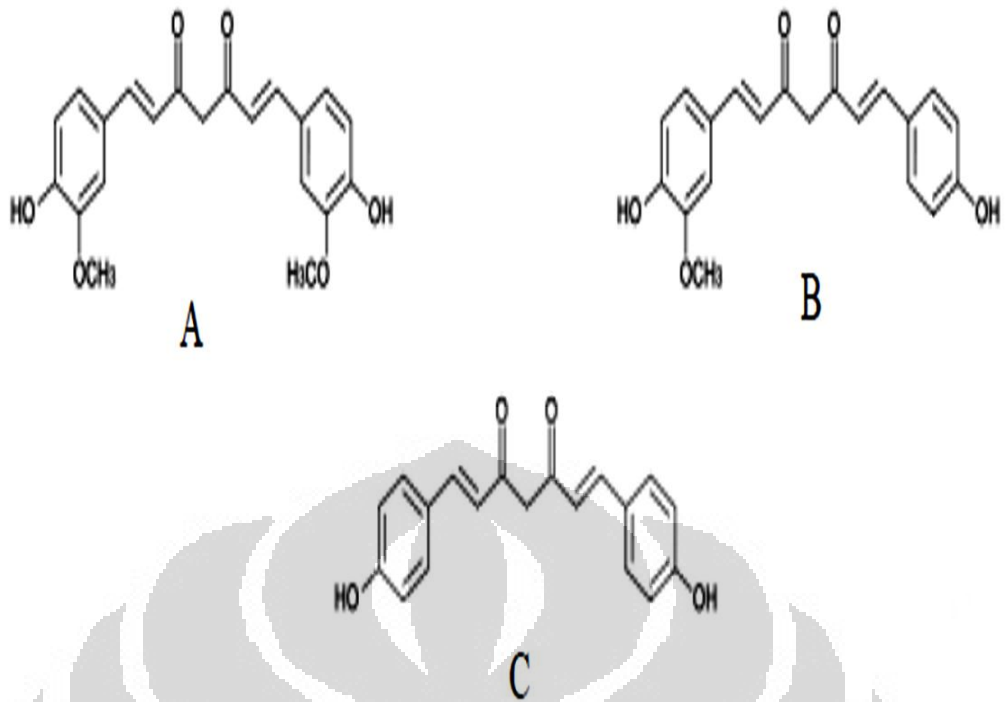
### a. Sifat Kimia

- Melting Point : 183°C
- Molar Mass : 368,38 g/mol
- Tidak larut di dalam air dan eter tetapi larut di dalam alkohol
- Di dalam alkali warnanya akan menjadi merah kecoklatan dan di dalam asam akan berwarna kuning terang.

### b. Sifat Fisika

- Bentuk : serbuk
- Warna : kuning terang atau kuning kemerahan

Di alam, kurkumin selalu terdapat bersama dengan senyawa turunan lainnya yaitu desmetoksi kurkumin dan *bis*-desmetoksi kurkumin, yang dikenal dengan nama kurkuminoid (Tonnesen dan Karlsen, 1985). Kurkumin memiliki dua bentuk tautomer : keto dan enol. Struktur keto lebih dominan dalam bentuk padat, sedangkan struktur enol ditemukan dalam bentuk cairan.



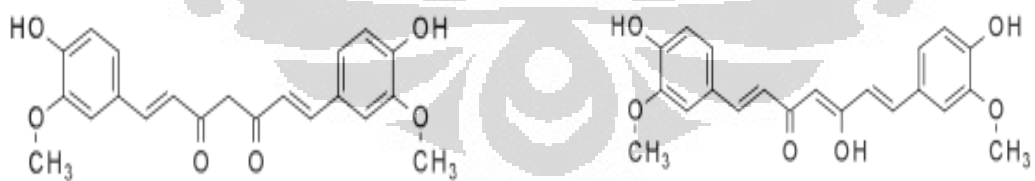
**Gambar 2.9** Struktur Kurkuminoid

Keterangan :

A = Struktur kurkumin

B = Struktur desmetoksi-kurkumin

C = Struktur bis-desmetoksi-kurkumin



(keto)

(enol)

**Gambar 2.10** Dua bentuk tautomer kurkumin: keto dan enol

### 2.10.1 Sumber Kurkumin

Kurkumin merupakan salah satu produk senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam rimpang tanaman famili Zingiberaceae antara lain : *Curcuma longa* syn, *Curcuma domestica* (kunyit) dan *Curcuma xanthorrhiza* (temulawak).

Temulawak merupakan tanaman obat berupa tumbuhan rumpun berbatang semu. Di daerah Jawa Barat temulawak disebut sebagai koneng gede sedangkan di Madura disebut sebagai temu lobak. Tanaman asli Indonesia ini menurut pelbagai penelitian memang begitu banyak khasiatnya bagi kesehatan mulai dari kemampuannya meningkatkan kerja ginjal serta antiinflamasi hingga menjadi obat ampuh untuk jerawat, peningkatan nafsu makan, antikolesterol, antiinflamasi, antianemia, antioksidan, pencegah kanker, dan antimikroba

#### Klasifikasi:

Divisi : Spermatophyta  
Sub divisi : Angiospermae  
Kelas : Monocotyledonae  
Ordo : Zingiberales  
Keluarga : Zingiberaceae  
Genus : *Curcuma*  
Spesies : *Curcuma xanthorrhiza* ROXB.

(<http://www.warintek.ristek.go.id/pertanian/temulawak.pdf>)

### 2.10.2 Aktivitas Biologi Kurkumin

Kurkumin dikenal sebagai bahan alam yang mempunyai aktivitas biologis berupa zat warna kuning . Zat warna kuning ini sering digunakan sebagai bahan tambahan makanan, bumbu, atau obat-obatan dan tidak menunjukkan efek toksik (Meiyanto, 1999). Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa kurkumin aman dan tidak toksik bila dikonsumsi oleh manusia. Jumlah kurkumin yang aman dikonsumsi oleh manusia adalah 100 mg/ hari sedangkan untuk tikus 5 g/hari (Commandeur dan Vermeulen, 1996).

Kurkumin mempunyai aktivitas farmakologi yang sangat luas antara lain sebagai antiinflamasi, antioksidan, dan antikanker (Majeed *et al*, 1995).

Hubungan struktur dan aktivitas kurkumin terkait dengan gugus-gugus fungsional senyawa tersebut, yaitu sebagai berikut:

- a) Aktivitas antioksidan oleh gugus hidroksi pada inti aromatik,



- b) Gugus  $\beta$  diketon dan ikatan rangkap berperan dalam aktivitas biologis sebagai antiinflamasi, antikanker dan antimutagenik.
- c) Dua cincin aromatis baik simetris maupun tidak simetris menentukan potensi ikatan antara senyawa obat dengan reseptor.

(Majeed, et al. 1995).

Kurkumin juga telah banyak diteliti aktivitasnya sebagai anti kanker payudara karena mampu menghambat interaksi estrogen dengan reseptornya (Verma et. al, 1998). Dalam penelitian yang lain, dibuktikan bahwa secara *in vitro*, kurkumin pada sel kanker payudara mampu menghambat *Reactive Oxygen Species (ROS)* dan jalur *c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)* yang akan menginduksi terjadinya apoptosis sampai 70 % (Somasundaram et al., 2003).

Reseptor progesteron memiliki peranan pada regulasi proses proliferasi sel kanker payudara, yang tidak kalah pentingnya dengan reseptor estrogen. Hormon progesteron menginduksi proliferasi sel sehingga dapat memacu kanker. Efek proliferasi ini dapat dihambat dengan pengeblokan reseptor tersebut oleh senyawa yang mampu berkompetisi dengan hormon progesteron, yang dikenal sebagai *Selective Progesterone Receptor Modulators (SPRMs)* (Hoffman, 2004). Pebriana, et al. (2008) telah membuktikan secara *in silico* kurkumin dan senyawa analog kurkumin: PGV-0, PGV-1, HGV-0, dan HGV-1, hasil modifikasi dari kurkumin, memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara.

Beberapa penelitian menunjukkan kurkumin disamping sebagai senyawa anti kanker juga menunjukkan aktivitas sebagai immunomodulator. Penelitian-penelitian yang telah dilakukan tersebut bertujuan untuk mengetahui pengaruh kurkumin terhadap sistem imunitas baik menggunakan hewan coba maupun kultur sel.

Hasil evaluasi pemberian *kurkumin* harian pada tikus dengan dosis 1, 20 atau 40 mg/kg, setelah 5 minggu menunjukkan dosis tertinggi kurkumin meningkatkan level IgG secara signifikan tetapi aktivitas *delayed-type hypersensitivity* dan *natural killer cell* sama dengan nilai kontrol pada semua dosis kurkumin (South, Exon, & Hendrix, 1997). Analisa aktivitas immunomodulator kurkumin pada mencit *Balb/c* ditemukan peningkatan total WBC secara signifikan pada hari ke 12. Kurkumin juga meningkatkan sirkulasi *antibody titre* terhadap SRBC. Kurkumin meningkatkan *plaque forming cells (PFC)* pada *spleen* dan jumlah maksimum PFC teramati pada hari ke 6 setelah immunisasi dengan SRBC. Sel *Bone marrow cellularity* dan *alpha-esterase positive* juga meningkat oleh Kurkumin. Aktivitas fagosit makrofag juga teramati meningkat (Antony, Kuttan, & Kuttan, 1999). Varalakshmi,

et al (2008) melalui penelitian *in vivo* menyatakan bahwa kurkumin dapat memodulasi sistem imun dengan cara meningkatkan kemampuan proliferasi sel T.

### **2.11 Kultur Sel**

Kultur sel ialah suatu proses dimana suatu sel dari suatu jaringan diambil dan ditumbuhkan pada kondisi yang terkontrol dan aseptik. Sel yang digunakan untuk dikultur biasanya diambil dari jaringan eukaryota. Sel tersebut akan tumbuh dan bertambah banyak dalam kondisi *in vitro*.

Kultur sel merupakan teknik laboratorium yang sangat berguna untuk bermacam-macam aplikasi di bidang farmakologi, anatomi, fisiologi, genetika maupun molekular biologi. Kultur jaringan yang pertama dilaksanakan dengan sukses pada tahun 1885 oleh Wilhelm Roux dan sekarang teknik kultur jaringan atau sel-sel dipergunakan dalam banyak aplikasi seperti produksi vaksin, perkembangan obat baru dan penghasilan insulin serta protein-protein lain.

Keuntungan kita dapat meneliti aktifitas intraselular, interaksi sebuah sel dengan sel lain, dampak perubahan genetika tertentu, efeknya pada kekurangan atau kebanyakan unsur nutrisi terhadap kesehatan sel-sel dan banyak hal lain. Teknik kultur jaringan mempunyai kelemahan, antara lain kebutuhan untuk kondisi yang sangat bersih dan steril, keahlian teknis, serta keraguan bahwa jaringan atau sel yang bertumbuh *in vitro* (yaitu “di dalam medium”) berbeda dengan jaringan atau sel yang *in vivo* (yaitu alami).

Lingkungan atau bahan makanan untuk pertumbuhan sel secara *in vitro* diusahakan menyerupai keadaan sel secara *in vivo*. Oleh karena itu, diperlukan suatu media pertumbuhan yang berisi asam-asam amino, vitamin, mineral, garam-garam anorganik, glukosa dan serum.

### **2.12 Pengujian Proliferasi Limfosit**

Proliferasi adalah proses perbanyakan sel melalui pembelahan sel atau mitosis sebagai respon terhadap antigen atau mitogen. Pada proses tersebut dihasilkan sel-sel efektor aktif yang berperan pada respon spesifik atau non spesifik untuk eliminasi mikroorganisme patogen dan zat asing lainnya. Proliferasi merupakan fungsi dasar biologis limfosit (Rose, et al., 1994) dan respon proliferasi secara *in vitro* dapat menggambarkan fungsi limfosit. Penambahan LPS dalam media kultur limfosit berfungsi sebagai mitogen yang terutama menstimulasi proliferasi sel limfosit B (Zakaria et al., 1996)

Proliferasi merupakan fungsi biologis pada sel limfosit, yaitu meliputi proses diferensiasi dan pembelahan sel. Aktivitas proliferasi limfosit merupakan salah satu

parameter yang dapat digunakan untuk mengukur status imunitas karena proses proliferasi menunjukkan kemampuan dasar dalam sistem imun. Limfosit merupakan sel tunggal yang bertahan baik saat dikultur dalam media sintetik lengkap. Respon proliferasi kultur limfosit dalam media sintetik dapat digunakan untuk menggambarkan fungsi limfosit dan status imun individu (Tejasari, 2000). Zakaria et al. (1996) menyatakan bahwa kemampuan limfosit untuk berproliferasi atau membentuk klon menunjukkan secara tidak langsung kemampuan respon imunologik atau tingkat kekebalan.

Proliferasi merupakan hasil dari interaksi sel dengan lingkungan yang menyertainya dengan demikian sudah dapat diterima jika lingkungan yang menyertai sel tidak memberikan kontribusi yang baik maka akan mengakibatkan keadaan yang tidak optimal bahkan mengalami kegagalan. Kondisi yang sebaliknya, kondisi yang sangat menunjang bagi pertumbuhan dan perbanyakan sel khususnya limfosit T seperti yang telah ditunjukkan oleh beberapa kelompok senyawa yang tercakup dalam *Biological Response Modifier* (BRM), menyebabkan interaksi antara ligand dan reseptor berjalan baik. Pada beberapa sitokin, kadang-kadang interaksi ini menimbulkan efek otokrin yang lebih lanjut menimbulkan efek otoaktivasi. Pengujian terhadap kemampuan fungsional limfosit dapat dilihat dari kemampuan memberikan respon terhadap mitogen (proliferasi sel), kemampuan membentuk imunoglobulin atau limfokin, dan kemampuan sitoksisitas sel NK (Tejasari, 2000).

Uji proliferasi limfosit dapat dilakukan melalui pengukuran kemampuan sel limfosit yang ditumbuhkan dalam kultur sel jangka pendek yang mengalami proliferasi klonal ketika dirangsang secara *in vitro* oleh antigen atau mitogen (Valentine dan Lederman, 2000). Mitogen adalah agen yang mampu menginduksi pembelahan sel, baik sel T sebagai aktivator poliklonal, karena dapat mengaktivasi banyak klon sel T atau sel B tanpa tergantung pada spesifitas antigennya maupun sel B dalam persentase yang tinggi, aktivitas mitogen adalah tidak spesifik. Mitogen biasa dikenal Bila sel diukur dengan senyawa mitogen maka limfosit akan berproliferasi secara tidak spesifik. Begitu pula, bila limfosit dikultur dengan antigen spesifik maka limfosit akan berproliferasi secara spesifik.

Menurut Hercowitz (1993) mitogen atau antigen tidak spesifik seperti ConA (Conavalin) dan LPS (Lipopolisakarida) mempunyai daya mengaktifkan sejumlah besar limfosit-limfosit tanpa memandang reaktivitas antigenik sel-sel yang bersangkutan. Hal ini terjadi karena adanya gangguan pada membran yang dirangsang oleh ikatan silang makromolekul permukaan tertentu yang merangsang limfosit untuk membelah. Mitogen Con A dan LPS

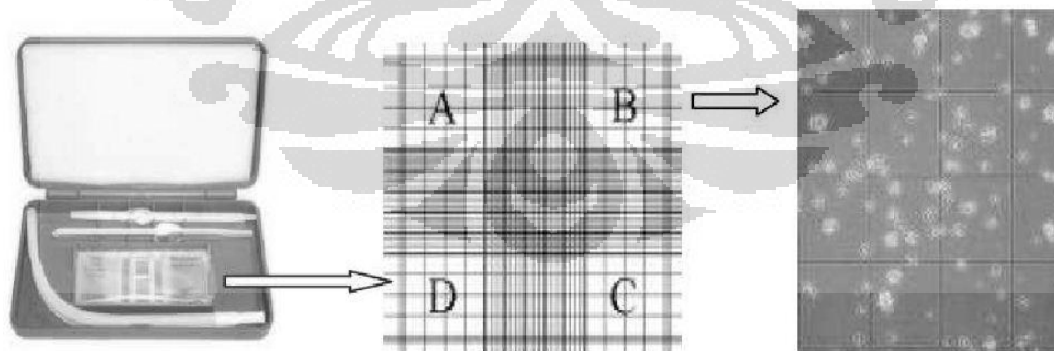
dapat merangsang terjadinya transformasi blast subpopulasi sel limfosit T (Atal, 1986). Transformasi blast (sel muda) adalah sederetan peristiwa dimana sel-sel bertambah besar, nukleus membesar, retikulum endoplasmic menjadi kasar dan tubulus mikro menjadi jelas, kecepatan sintesis DNA bertambah dan terjadi mitosis (Pereyra, et al, 2005).

Metode yang lebih sederhana untuk mengetahui jumlah sel yang berproliferasi dapat dilakukan dengan hemositometer dibawah mikroskop. Syarat penghitungan sel dengan metode hemositometri adalah sel harus "berdiri" sendiri-sendiri/ tidak menggerombol.

### 2.13 Hemositometer

Hemositometer atau *haemocytometer* adalah perangkat awalnya dirancang untuk penghitungan sel darah. Sekarang juga digunakan untuk menghitung jenis sel serta partikel mikroskopis lainnya.

Hemositometer ini ditemukan oleh *Louis-Charles Malassez* dan terdiri dari sebuah slide mikroskop kaca tebal dengan lekukan persegi panjang yang menciptakan sebuah kamar. Ruangan ini adalah diukir dengan laser-grid tergores garis tegak lurus. Perangkat ini dibuat dengan hati-hati sehingga daerah yang dibatasi oleh garis diketahui, dan kedalaman ruang ini juga dikenal. Oleh karena itu mungkin untuk menghitung jumlah sel atau partikel dalam suatu volume tertentu cairan, dan dengan demikian menghitung konsentrasi sel dalam cairan secara keseluruhan



**Gambar 2.11** Haemositometer

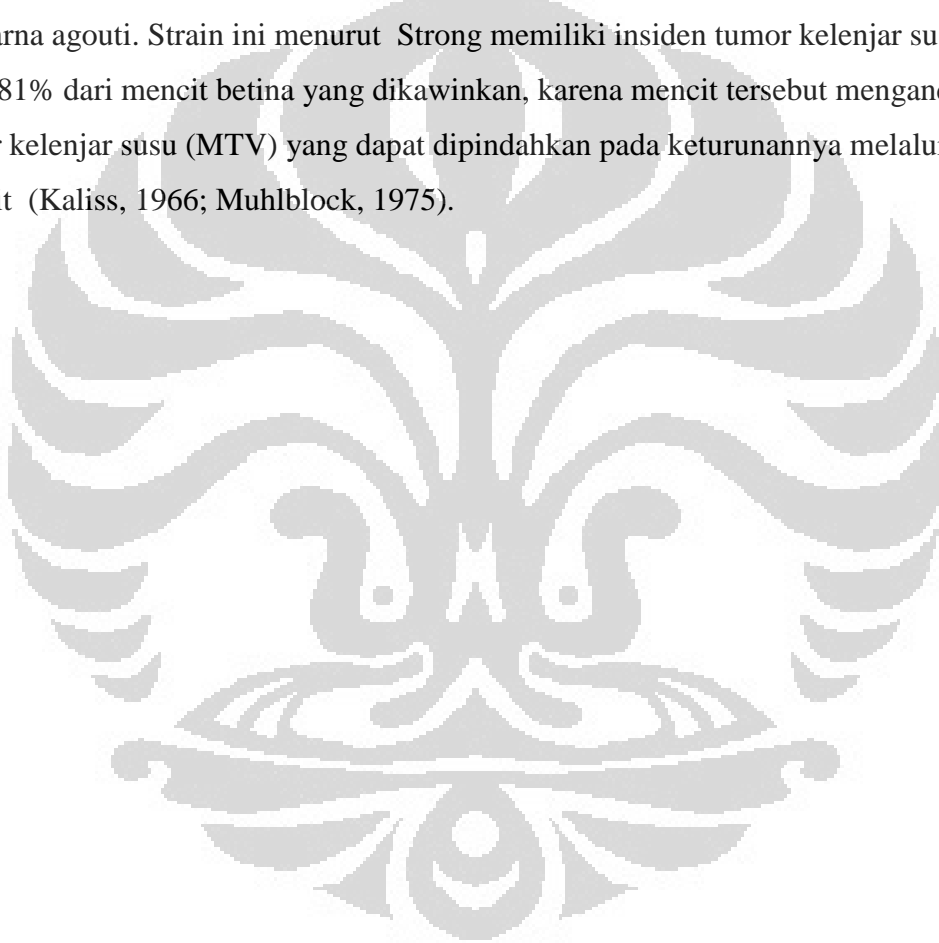
Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung. Setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak.

Hitung jumlah sel per mL dengan rumus dibawah ini :

$$\text{Jumlah sel terhitung /mL} = \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

#### 2.14. Tumor Kelenjar Susu *Transplantable* pada Mencit

Mencit strain C3H berasal dari WE Heston *National Cancer Institute* di Amerika, berwarna agouti. Strain ini menurut Strong memiliki insiden tumor kelenjar susu yang tinggi yaitu 81% dari mencit betina yang dikawinkan, karena mencit tersebut mengandung virus tumor kelenjar susu (MTV) yang dapat dipindahkan pada keturunannya melalui air susu mencit (Kaliss, 1966; Muhlblock, 1975).



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

### 3.2 Bahan

- Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Dipilih mencit betina berumur 4 bulan dengan berat 15-20 gram
- Kurkumin yang digunakan dalam penelitian ini berupa kapsul herbal yang berisi serbuk warna kuning yang diperoleh dari Departemen Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bahan-bahan untuk kultur limfosit:
  1. Sel limfosit dari limfa mencit betina strain C3H bertumor payudara setelah 2 minggu transplantasi.
  2. Medium RPMI 1640 pH 7,2 - 7,4 (GIBCO)
  3. *Sodium bicarbonate*
  4. *Fetal bovine serum* (Biosera)
  5. *Fungizone*
  6. Gentamisin
  7. Gas CO<sub>2</sub> (Perum aneka gas)
  8. NaOH
  9. HCl
  10. *Nylon net steril*
  11. Membran filter *milipore*
  12. *Aquabidest steril*
  13. Dietil eter
  14. Dimetil sulfoksida (DMSO) (AppliChem)

### 3.3 Alat

- Dalam penelitian ini digunakan peralatan sebagai berikut:
  1. Inkubator CO<sub>2</sub> (CO-150)
  2. Spuit
  3. Termometer
  4. *Laminar Flow Cabinet Class II* (Nuair)
  5. Cawan Petri
  6. Gunting bengkok dan lurus
  7. Pinset, scalpel
  8. Pipet
  9. Autoklaf
  10. Timbangan
  11. Alat sentrifugasi (MSE)
  12. Pipet Pasteur steril
  13. Mikropipet (Eppendorf)
  14. Mikroskop *phase contrast* (Nikon)
  15. Hemositometer (Neubauer improved)
  16. pH meter
  17. *Magnetic stirrer*
  18. *Refrigerator*
  19. *Freezer*
  20. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)
  21. Mikroplat 96 sumuran (*well*)

### 3.4 Analisis Kuantitatif Kurkumin dengan HPLC

Analisis kuantitatif kurkumin dengan HPLC dilakukan di Laboratoria Pengembangan Teknologi Agroindustri dan Biomedika (LAPTIAB), Serpong. Tangerang.

### 3.5 Sterilisasi Bahan dan Alat

Alat gelas dan larutan yang stabil pada pemanasan yang digunakan untuk kultur sel disterilkan dengan autoklaf pada 100 Kpa selama 20 menit. Larutan lainnya disterilkan dengan jalan filtrasi menggunakan membran filter 0.22  $\mu\text{m}$  *millipore*

### **3.6 Preparasi Medium Kultur**

Media RPMI 1640 (GIBCO BRL) 1,04 gram yang mengandung L-glutamin ditambahkan 1.2 g natrium karbonat (E. Merck) dan dilarutkan dan dihomogenkan dengan aquabides steril 1000 ml. Media kemudian dibuat pH 7.2 dengan menambahkan HCl/NaOH. Media disaring dengan menggunakan kertas saring 0.22  $\mu\text{m}$  *millipore* steril secara aseptik dan disimpan dalam lemari es pada suhu 2 – 8 °C.

Medium untuk kultur ditambahkan 5% *Fetal Bovine Serum*/FBS yang sebelumnya disimpan pada -15 °C dan diinaktifkan dengan inkubasi pada 56 °C selama 30 menit sebelum digunakan, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, dan 50  $\mu\text{M}$  mercaptoethanol sebanyak 2 ml untuk setiap 100 ml.

### **3.7 Prosedur Transplantasi Tumor**

Mencit donor dimatikan dengan dietil eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70%, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es. kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk “bubur tumor” yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor. Bubur tumor ditransplantasikan dengan disuntikkan ke subkutis di aksila kanan mencit resipien dengan dosis 0,2 ml dan dipelihara selama 2 minggu.

### **3.8 Preparasi Suspensi Sel Limfosit**

Setelah transplantasi selama 2 minggu mencit resipien dinarkosa dengan dietil eter. Limpa diambil dari rongga abdomen. Limpa terletak dibagian belakang rongga abdomen, dibalik lambung dibawah hepar. Setelah mati, bulu dan kulit disekitar abdomen disemprot alkohol 70% agar steril dan mulai dilakukan pembedahan dinding abdomen lapis demi lapis dengan menggunakan gunting dan pinset sampai membuka kantong peritonium. Setelah peritonium terbuka dan nampak isi abdomen, dengan menggunakan pinset organ abdomen yang menutupi limpa disingkirkan dan setelah nampak organ limpa yang berwarna merah tua kehitaman dicari pangkalnya kemudian dipotong. Setelah limpa terangkat kemudian



dibersihkan dari jaringan ikat penyerta. Kemudian limpa diletakkan pada cawan petri steril yang berisi 5 ml RPMI. Secara hati-hati limpa dicabik-cabik dengan menggunakan pinset steril Untuk mendapatkan suspensi sel limfosit, sel dilewatkan pada *nylon net* steril. Sedangkan untuk melisis eritrosit dilakukan dengan menambahkan bufer amonium klorida dan diinkubasi dalam inkubator 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> selama 30 menit kemudian endapan dibuang. Suspensi sel dicuci sebanyak dua kali dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang diganti dengan médium RPMI lengkap yang mengandung 10% FBS.

Jumlah sel kemudian dihitung dengan hemositometer dibawah mikroskop fase kontras. Suspensi sel dibuat menjadi 1 x 10<sup>6</sup> sel/ml untuk digunakan pada uji proliferasi sel limfosit.

### **3.9 Preparasi Larutan Kurkumin**

Larutan stok kurkumin 400 ppm dibuat dengan melarutkan 20 mg kurkumin didalam 50 mL DMSO. Larutan kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring 0.22 µm *millipore* steril secara aseptik dan disimpan dalam lemari es pada suhu 2 – 8 °C. Larutan stok kemudian digunakan untuk membuat larutan uji dengan konsentrasi 5, 25, dan 50 ppm.

### **3.10 Uji Proliferasi Sel Limfosit**

Sebanyak 180 µL kultur sel limfosit dimasukkan ke dalam sumur (*well*) kemudian mendapatkan dosis perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 ditambahkan 20 µL kurkumin dengan kadar 5 ppm (P1)
2. Kelompok 2, ditambahkan 20 µL kurkumin dengan kadar 25 ppm (P2)
3. Kelompok 3, ditambahkan 20 µL kurkumin dengan kadar 50 ppm (P3)
4. Kelompok 4, tidak ditambahkan kurkumin sebagai kontrol negatif (K)

Masing-masing kelompok perlakuan dibuat tiga ulangan.

Plat *well* yang telah mengandung suspensi sel dan kurkumin diinkubasi dalam inkubator pada 37 °C dan 5% CO<sub>2</sub>.

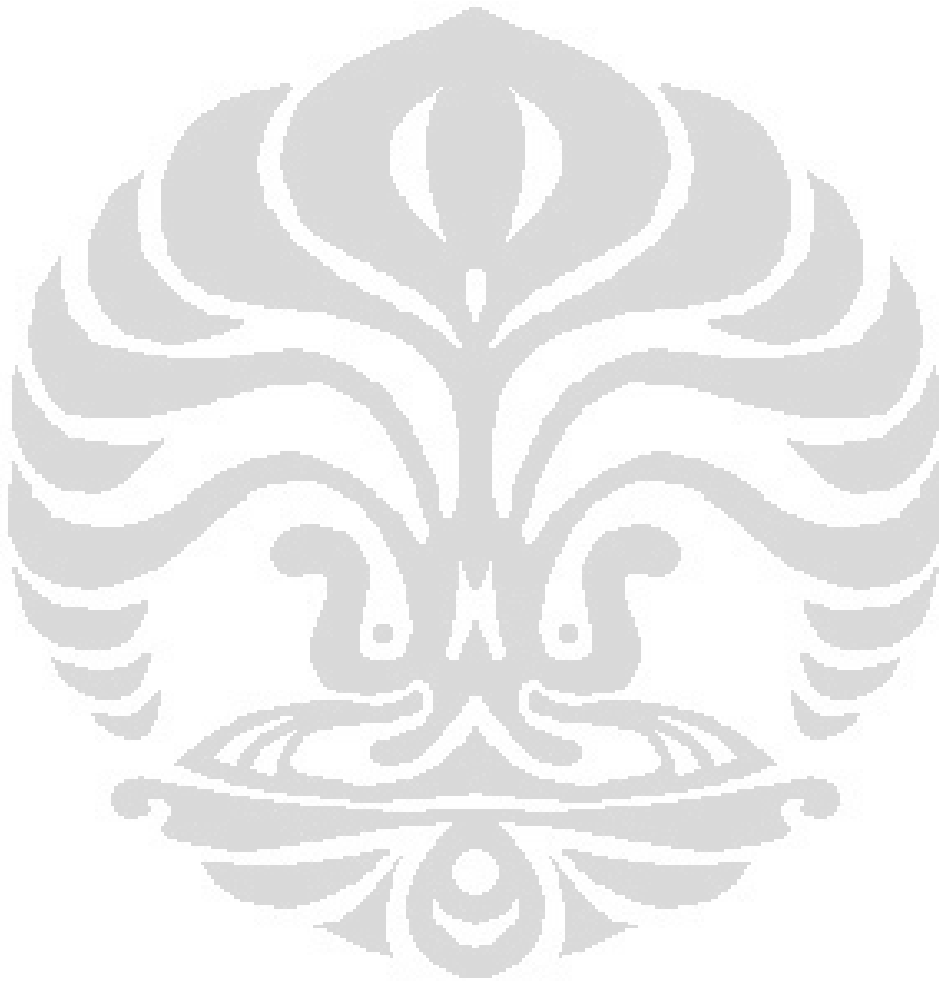
Pengamatan dan perhitungan sel dilakukan setiap hari selama 5 hari yaitu hari ke 1, 2, 3, 4, dan 5. Pengamatan sel hidup dan mati menggunakan pewarna *tryphan blue*. Sel hidup berwarna terang, sel mati berwarna gelap karena menyerap *tryphan blue* (Snell and Mullock, 1987). Penghitungan jumlah sel dilakukan dengan haemositometer dibawah mikroskop fase kontras.

### 3.11 Analisis Statistik

Analisa data dilakukan berdasarkan analisa statistik menggunakan program SPSS

16.0 for windows :

- Pertama dilakukan analisis deskriptif dengan perhitungan *arithmetic mean* dan standard deviasi dan membuat grafik *boxplot*
- Dilakukan uji normalitas data dengan uji *Kolmogorov-smirnov*
- Dilanjutkan uji ANOVA satu arah
- Dilanjutkan uji *Post Hoc Duncan*



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Analisis Kuantitatif Kurkumin dengan HPLC

Kurkumin yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk biofarmaka berupa sediaan herbal berbentuk kapsul yang berisi serbuk warna kuning yang diperoleh dari Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Serbuk kurkumin ini berasal dari rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza ROXB*) yang mengandung senyawa kurkuminoid. Kurkuminoid rimpang temulawak terdiri dari campuran komponen senyawa yang bernama kurkumin, bis-desmetoksi kurkumin dan desmetoksi kurkumin mempunyai warna kuning atau kuning jingga, berbentuk serbuk dengan rasa sedikit pahit, larut dalam aseton, alkohol, asam asetat glasial, DMSO, dan alkali hidroksida. Kurkumin tidak larut dalam air dan dietileter. Kurkuminoid mempunyai aroma khas, tidak bersifat toksik (Kiso, 1985).

Sebelum serbuk kurkumin ini digunakan untuk uji proliferasi sel limfosit penting untuk dilakukan analisis kuantitatif serbuk kurkumin tersebut untuk mengetahui komposisinya.

Analisis kuantitatif kurkumin pada penelitian ini digunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan menggunakan senyawa standar yaitu bis-desmetoksi-kurkumin, desmetoksi-kurkumin, kurkumin.

Kondisi HPLC yang dipergunakan adalah sebagai berikut:

Kolom	: Agilent, Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 x 150 mm, 5 $\mu$ m
Fase gerak	: Acetonitrile : Asam Asetat 1% = 55 :45
Kecepatan aliran	: 1,0 mL/menit
Detektor	: UV VIS 426 nm
Volume injeksi	: 20 $\mu$ L
Sensitivitas	: 0.01 AUFS

Penentuan komposisi dilakukan berdasarkan perhitungan luas kurva sampel dibandingkan dengan standar (Lampiran 5)

**Tabel 4.1** Komposisi senyawa kurkuminoid dalam serbuk kurkumin

<b>Kode Sampel</b>	<b>Kadar bisdesmetoksi (%)</b>	<b>Kadar desmetoksi (%)</b>	<b>Kadar Kurkumin (%)</b>	<b>Total Kadar Kurkuminoid (%)</b>
Ulangan 1	0,2545318	3,109247	20,61625	23,980
Ulangan 2	0,221908	3,089594	20,39478	23,706
<b>Rerata</b>	<b>0,238</b>	<b>3,099</b>	<b>20,506</b>	<b>23,843</b>

Hasil analisa komposisi serbuk kurkumin pada Tabel 4.1 menunjukkan total kurkuminoid dalam serbuk adalah 23,8% dengan kurkumin adalah yang paling dominan dengan persentase 20,5% diikuti dengan desmetoksi-kurkumin 3,1% dan yang paling sedikit adalah bis-desmetoksi-kurkumin 0,2%, sedangkan sisanya adalah 80% adalah bahan pengemas yang biasa terdapat dalam sediaan herbal tradisional (Lampiran Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI Nomor:HK.00.05.4.1380).

Total kurkuminoid dari serbuk kurkumin yang akan digunakan dalam penelitian ini memiliki kandungan kurkuminoid yang hampir sama dengan sediaan herbal komersial lainnya seperti Cursil®70 yang di dalam kemasannya dinyatakan berguna untuk mencegah dan mengobati penyakit kuning juga gangguan pada hati. Kandungan kurkumin pada sediaan herbal komersial Cursil®70 menurut hasil penelitian Irmanida, Mohammad, Latifah, Darusman (2005) adalah sebesar 166,5 mg/500 atau 33.3%.

#### **4.2 Transplantasi Tumor**

Pada penelitian ini dilakukan transplantasi tumor payudara kepada hewan percobaan mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Strain ini memiliki insiden tumor kelenjar susu yang tinggi yaitu 81% dari mencit betina yang dikawinkan, karena mencit tersebut mengandung virus tumor kelenjar susu (MTV) yang dapat dipindahkan pada keturunannya melalui air susu mencit (Kaliss, 1966; Muhlblock, 1975). Tumor kelenjar susu mencit C3H tersebut dapat ditransplantasikan berulang-ulang pada mencit penerima singenik. Tumor hasil transplantasi tumbuh progresif sampai membunuh inangnya dan mencit C3H tidak memerlukan pengaruh hormon dalam tumorigenesis.

Sel tumor yang telah ditransplantasikan pada mencit strain C3H akan tampak tumbuh menonjol 2 minggu setelah transplantasi dilakukan.



**Gambar 4.1** Mencit strain C3H bertumor payudara

Dipilihnya mencit bertumor kelenjar susu sebagai sumber limfosit yang akan dikultur secara *in vitro* pada penelitian ini dikarenakan pada mencit bertumor, limfositnya telah mengalami aktivasi oleh antigen tumor sebagai respon imun limfosit terhadap sel tumor. Keaktifan ini di antaranya ditentukan oleh produksi reseptor IL-2R. IL-2R pada limfosit T terdiri atas 2 protein yang berbeda yaitu p55 dan p70-75. p55 merupakan polipeptida dengan panjang 55 kD yang terdapat hanya pada limfosit T yang sedang teraktivasi oleh antigen. Berbeda dengan p70-75 dengan panjang 70-75 kD yang dibentuk juga pada keadaan limfosit T inaktif. Masing-masing polipeptida tersebut memiliki afinitas mengikat IL-2 yang rendah. Sebaliknya bila terjadi kompleks antara kedua jenis polipeptida tersebut maka afinitas pengikatan IL-2 menjadi tinggi (Arai, et al.,1990; Smith, 1990). Reseptor IL-2R pada permukaan membran sel limfosit T mempunyai peranan yang penting sebagai reseptor untuk proliferasi sel limfosit ketika ada antigen atau mitogen.

### 4.3 Preparasi Suspensi Sel Limfosit

Untuk menguji aktivitas imunomodulator kurkumin pada proliferasi sel limfosit pada penelitian ini digunakan sel limfosit yang berasal dari limpa mencit C3H bertumor payudara setelah 2 minggu transplantasi . Isolasi limpa dilakukan dengan pembedahan pada rongga abdomen. Limpa terletak dibagian belakang rongga abdomen, dibalik lambung dibawah hepar.



**Gambar 4.2** Limpa mencit strain C3H bertumor payudara

Hasil isolasi limpa menunjukkan limpa berwarna merah-ungu . Limpa dibungkus oleh kapsula, yang terdiri atas dua lapisan, yaitu satu lapisan jaringan penyokong yang tebal dan satu lapisan otot halus. Limpa terdiri atas pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa limpa ini menempati ruang antara trabekula dan simpai pembungkus limpa. Pulpa putih terdiri atas jaringan limfoid yang menyelubungi arteri sentralis dan nodulus limfatikus yang ada pada selubung. Sel-sel limfoid yang mengelilingi arteri sentralis terutama adalah limfosit T. sedangkan nodulus limfatikus terutama terdiri dari limfosit B.

Limpa merupakan salah satu organ yang bertanggung jawab terhadap pemenuhan kebutuhan limfosit khususnya dalam proliferasi dan diferensiasi limfosit T (Junqueira, Carneiro, & Kelley, 1997)

Suspensi sel limfosit pada penelitian ini didapatkan dari limpa yang dicabik-cabik dengan menggunakan pinset steril kemudian dilewatkan pada *nylon net* steril untuk mendapatkan suspensi yang bebas dari jaringan limpa lainnya. Sedangkan untuk melisis eritrosit yang terikut bersama suspensi dilakukan dengan menambahkan bufer amonium klorida dan diinkubasi dalam inkubator 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> selama 30 menit kemudian endapan dibuang. Suspensi sel dicuci sebanyak dua kali dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan suspensi limfosit yang lebih bersih lagi.



**Gambar 4.3** Suspensi sel limfosit

Hasil pengamatan sel limfosit limpa mencit dibawah mikroskop, menunjukkan bentuk sel limfosit yang bulat dan bergerombol dengan inti yang berukuran kecil, seperti dapat dilihat pada Gambar 4.3. Sel limfosit yang diperoleh merupakan campuran sel B dan sel T. Antara sel B dan sel T tidak dapat dibedakan, karena secara morfologik kedua sel tersebut sama.. Sel limfosit merupakan sel dengan inti yang besar dan bulat serta memiliki sedikit plasma. Hasil isolasi suspensi sel limfosit pada penelitian ini didapatkan suspensi limfosit yang telah bersih dari jaringan dan pengotor lainnya dan siap digunakan untuk uji proliferasi.

#### **4.4 Uji Proliferasi Sel Limfosit**

Beberapa penelitian menunjukkan kurkumin disamping sebagai senyawa anti kanker juga menunjukkan aktivitas sebagai immunomodulator. Aktivitas immunomodulator suatu senyawa dapat diketahui melalui uji proliferasi sel limfosit. Proliferasi adalah proses perbanyakan sel melalui pembelahan sel atau mitosis sebagai respon terhadap antigen atau mitogen. Proliferasi limfosit merupakan penanda adanya fase aktivasi dari respon imun

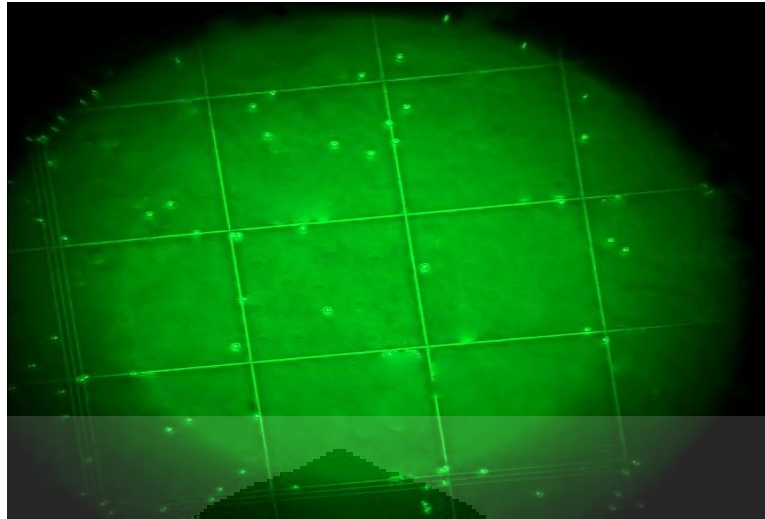
tubuh. Untuk melihat pengaruh perlakuan kurkumin terhadap proliferasi sel limfosit pada penelitian ini dilakukan empat perlakuan berbeda berdasarkan variasi jumlah dosis kurkumin yang diberikan dimana satu kelompok dengan tanpa perlakuan kurkumin (K). Kelompok 1 ditambahkan kurkumin dengan dosis 5 ppm (P1), Kelompok 2 ditambahkan kurkumin dengan dosis 25 ppm (P2), Kelompok 3 ditambahkan kurkumin dengan dosis 50 ppm (P3).

Pada penelitian ini uji pengaruh kurkumin terhadap proliferasi sel limfosit ditentukan berdasarkan pengamatan dan penghitungan jumlah sel limfosit yang hidup selama 5 hari dimulai pada hari ke 1 setelah penambahan kurkumin dan seterusnya setiap hari sampai hari ke lima. Pengamatan sel hidup dan mati menggunakan pewarna *tryphan blue*. Sel hidup berwarna terang, sel mati berwarna gelap karena menyerap *tryphan blue* (Snell and Mullock, 1987). Penghitungan jumlah sel dilakukan dengan haemositometer dibawah mikroskop fase kontras.



(P1)

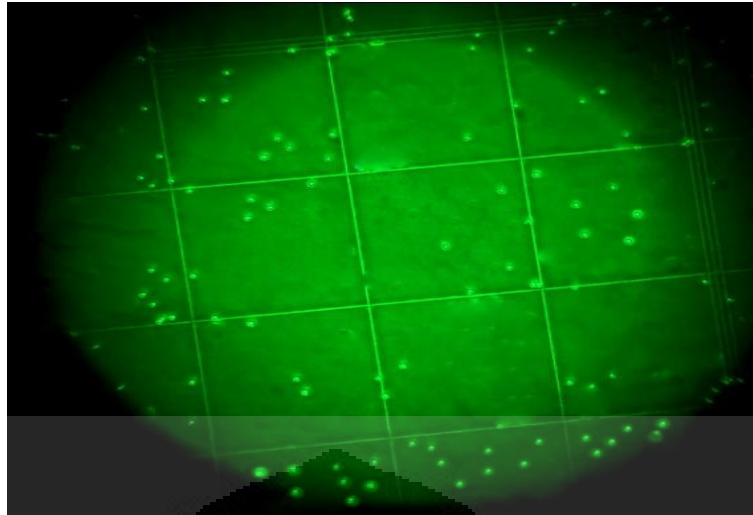




(P2)



(P3)



(K)

**Gambar 4.4** Penghitungan sel limfosit dengan haemositometer hari ke 1

#### 4.5 Pengaruh Dosis Kurkumin Terhadap Proliferasi Sel Limfosit

Pengaruh dosis kurkumin terhadap proliferasi sel limfosit pada penelitian ini ditentukan berdasarkan hasil penghitungan %Proliferasi sel limfosit:

$$\% \text{ Proliferasi Limfosit} = \frac{\text{Jumlah Sel Limfosit Perlakuan}}{\text{Jumlah Sel Limfosit tanpa Perlakuan}} \times 100 \%$$

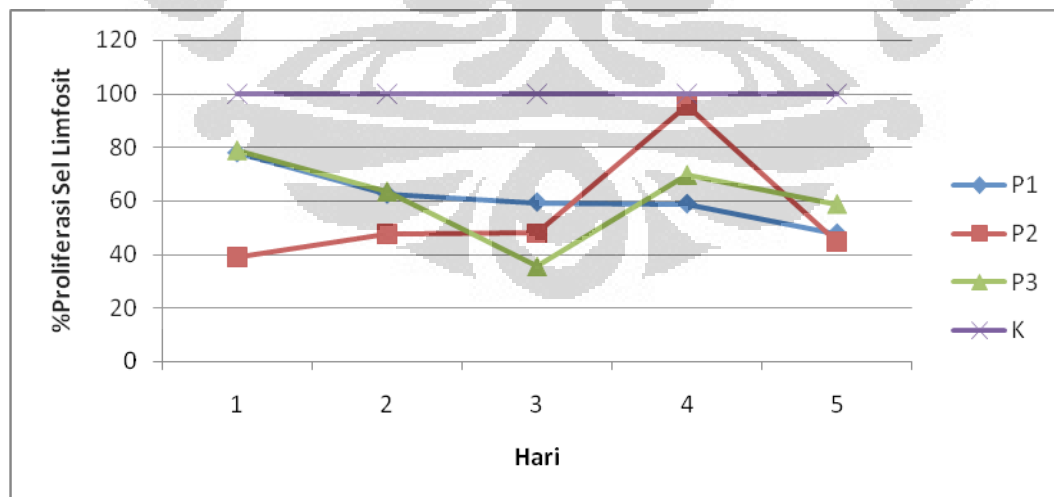
**Tabel 4.2** Hasil penghitungan %Proliferasi Sel Limfosit\*

Hari ke	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel Limfosit	%Proliferasi Sel Limfosit
1	K (Tanpa Kurkumin)	702.500±36.827	100
	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	548.333±35.030	78
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	272.500±77.015	39
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	555.000±85.440	79

2	K (Tanpa Kurkumin)	625.000±40.234	100
	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	390.833±78.453	63
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	296.667±20.207	47
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	398.333±64.920	64
3	K (Tanpa Kurkumin)	515.000±47.893	100
	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	306.667±12.583	60
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	245.833±48.240	48
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	184.167±31.258	36
4	K (Tanpa Kurkumin)	411.667±22.407	100
	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	242.500±38.810	59
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	393.333±101.036	96
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	287.500±76.035	70
5	K (Tanpa Kurkumin)	477.500±58.790	100
	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	228.333±44.464	48
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	213.333±55.920	45
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	281.667±12.829	59

\*Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan dengan 3 kali ulangan

Proliferasi pada sel limfosit meningkat jika % Proliferasi Sel Limfosit dengan perlakuan kurkumin lebih besar dari tanpa perlakuan (Miksusanti, 2010). Jika % Proliferasi Sel Limfosit perlakuan kurkumin kurang dari tanpa perlakuan berarti perlakuan kurkumin menyebabkan penekanan pada proliferasi sel limfosit (S.N. Depamede & A. Rosyidi, 2009).

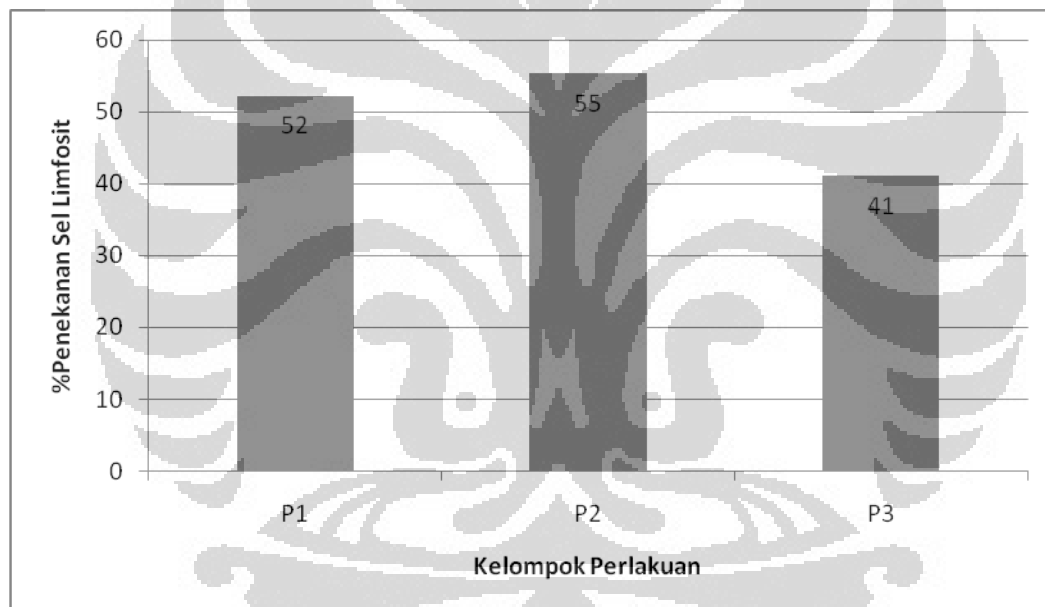


**Gambar 4.5** %Proliferasi Sel Limfosit selama 5 hari pengamatan

Gambar 4.5 menunjukkan semua nilai % Proliferasi Sel Limfosit kelompok perlakuan kurkumin hari ke 1 sampai hari ke 5 lebih rendah dari nilai % Proliferasi Sel Limfosit kelompok tanpa perlakuan kurkumin. Hal ini berarti perlakuan kurkumin dengan dosis 5, 25, dan 50 ppm pada sel limfosit tidak menyebabkan proliferasi tetapi menyebabkan penekanan pada proliferasi sel limfosit.

Besarnya nilai penekanan proliferasi sel limfosit oleh kurkumin pada penelitian ini ditentukan berdasarkan pada waktu inkubasi hari ke 5 sebagai berikut:

$$\% \text{Penekanan Limfosit} = \frac{\text{Jumlah Sel Limfosit tanpa Perlakuan} - \text{Jumlah Sel Limfosit Perlakuan}}{\text{Jumlah Sel Limfosit tanpa Perlakuan}} \times 100\%$$



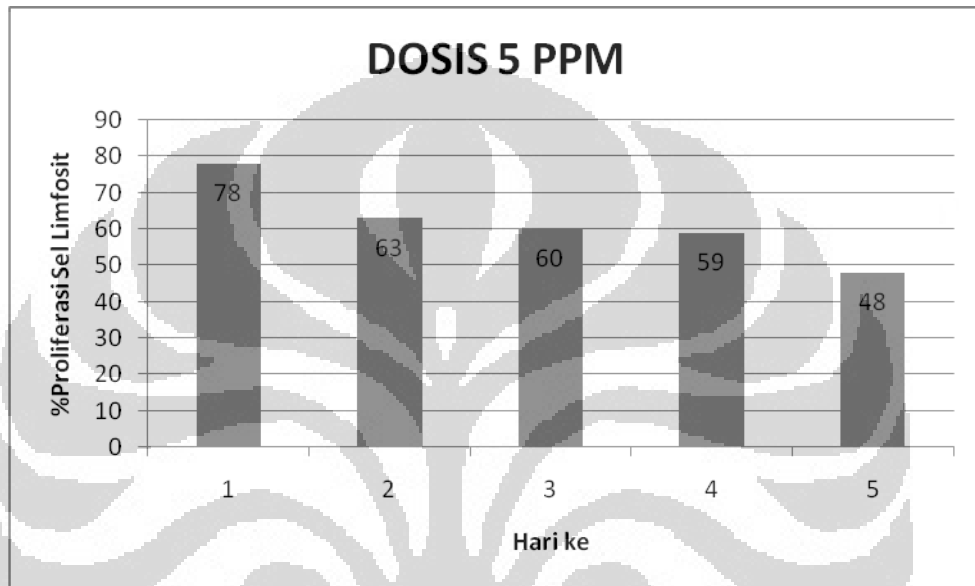
**Gambar 4.6** Hasil penghitungan %penekanan sel limfosit sampai hari ke 5

Hasil penghitungan %penekanan sel limfosit (Gambar 4.6) pada inkubasi hari ke 5 menunjukkan perlakuan sel limfosit dengan kurkumin 5 ppm menyebabkan penekanan sebesar 52%, perlakuan kurkumin 25 ppm menyebabkan penekanan sebesar 55%, dan perlakuan kurkumin 50 ppm menyebabkan penekanan sebesar 41%. Hasil ini juga menunjukkan kenaikan dosis kurkumin tidak berhubungan dengan kenaikan %penekanan proliferasi sel limfosit.

#### 4.6 Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Proliferasi Sel Limfosit

Pengaruh lama waktu inkubasi dianalisis dengan membandingkan %Proliferasi Sel Limfosit setiap dosis pada hari ke 2, 3, 4, dan 5 dengan %Proliferasi Sel Limfosit hari ke 1. Lama waktu inkubasi dianggap berpengaruh signifikan terhadap proliferasi sel limfosit jika %Proliferasi Sel Limfosit hari ke 2, 3, 4, dan 5 lebih tinggi dari %Proliferasi Sel Limfosit hari ke 1.

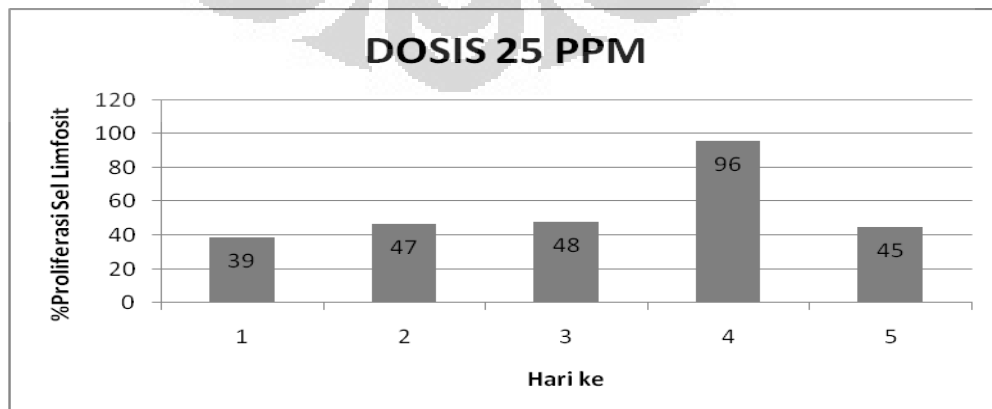
##### Dosis 5 ppm



Gambar 4.7 Waktu inkubasi sel limfosit dosis 5 ppm

Gambar 4.7 menunjukkan pada hari ke 2, 3, 4, dan 5 %proliferasi sel limfosit lebih rendah dari hari ke 1. Hal ini berarti untuk perlakuan kurkumin dengan dosis 5 ppm, waktu inkubasi hari ke 2, 3, 4, dan 5 tidak berpengaruh signifikan terhadap proliferasi sel limfosit.

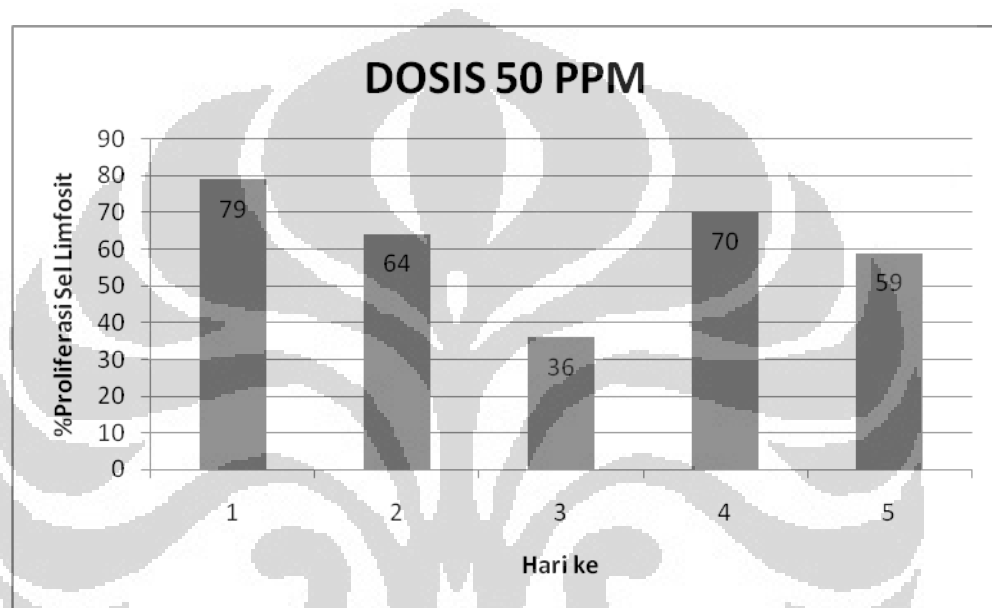
##### Dosis 25 ppm



Gambar 4.8 Waktu inkubasi sel limfosit dosis 25 ppm

Gambar 4.8 menunjukkan pada hari ke 2, 3, 4, dan 5 %proliferasi sel limfosit lebih tinggi dari hari ke 1. %proliferasi sel limfosit hari ke 5 lebih rendah dari hari ke 4. Hal ini berarti untuk perlakuan kurkumin dengan dosis 25 ppm, waktu inkubasi hari ke 2, 3, dan 4 berpengaruh signifikan terhadap proliferasi sel limfosit tetapi waktu inkubasi hari ke 5 tidak berpengaruh signifikan karena tidak terjadi proliferasi setelah hari ke 4 walaupun %proliferasi sel limfosit hari ke 5 lebih tinggi dari hari ke 1.

#### Dosis 50 ppm



**Gambar 4.9** Waktu inkubasi sel limfosit dosis 50 ppm

Gambar 4.9 menunjukkan pada hari ke 2, 3, 4, dan 5 %proliferasi sel limfosit lebih rendah dari hari ke 1. Hal ini berarti untuk perlakuan kurkumin dengan dosis 50 ppm waktu inkubasi hari ke 2, 3, 4, dan 5 tidak berpengaruh signifikan terhadap proliferasi sel limfosit.

#### 4.7 Analisis Statistik

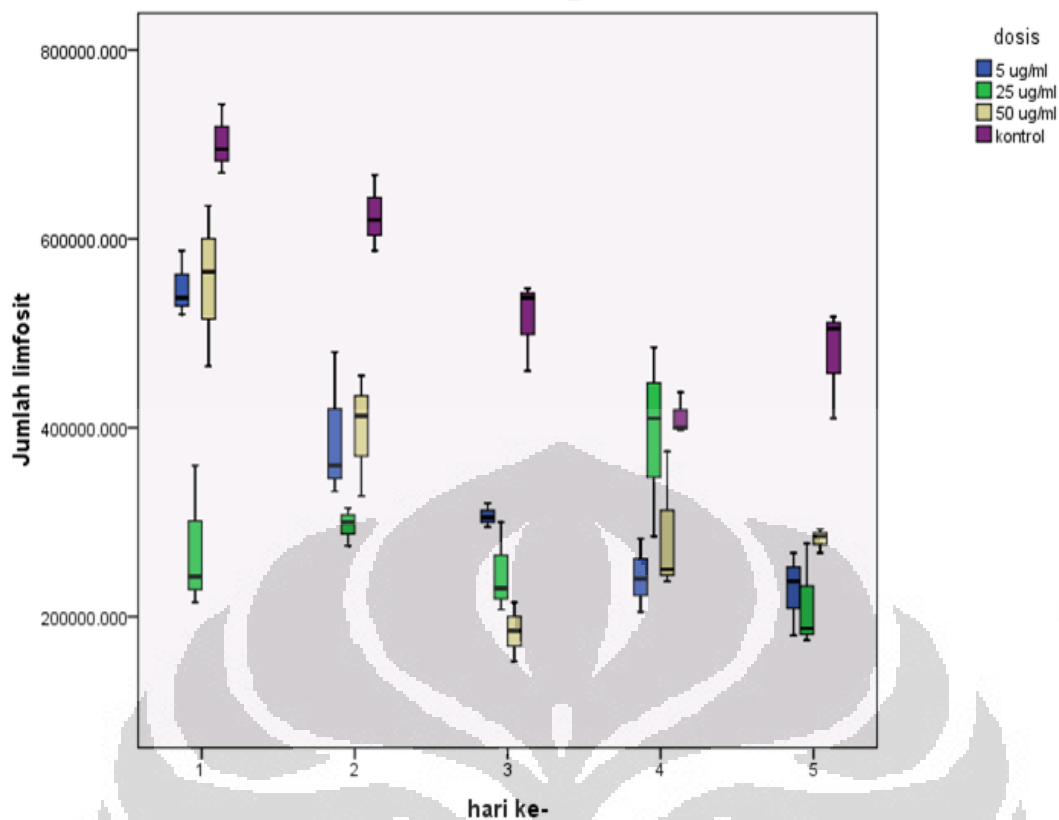
Untuk melengkapi analisis pengaruh perlakuan kurkumin dengan dosis 5, 25, dan 50 ppm terhadap proliferasi sel limfosit diatas dilakukan analisis statistik pada data hasil penghitungan jumlah limfosit. Pada penelitian ini analisis statistik menggunakan program statistik SPSS 16.0 *for windows*.

Analisis statistik pertama yang dilakukan adalah analisis deskriptif dengan perhitungan *arithmetic mean* dan standar deviasi (Tabel.4.3) dan grafik *boxplot* (Gambar 4.10) terhadap 60 data jumlah sel limfosit.

*Boxplot* merupakan ringkasan distribusi sampel yang disajikan secara grafis untuk menggambarkan bentuk distribusi data, ukuran tendensi sentral dan ukuran penyebaran (keragaman) data pengamatan.

**Tabel. 4.3** Rata-rata jumlah sel limfosit

Hari ke	Kelompok Perlakuan	N	Mean	Standar Deviasi	%Standar Deviasi
1	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	3	548.333	35.030	6,39
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	3	272.500	77.015	28,26
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	3	555.000	85.440	15,39
	K (Tanpa Kurkumin)	3	702.500	36.827	5,24
2	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	3	390.833	78.453	20,07
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	3	296.667	20.207	6,81
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	3	398.333	64.920	16,30
	K (Tanpa Kurkumin)	3	625.000	40.234	6,44
3	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	3	306.667	12.583	4,10
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	3	245.833	48.240	19,62
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	3	184.167	31.258	16,97
	K (Tanpa Kurkumin)	3	515.000	47.893	9,30
4	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	3	242.500	38.810	16,00
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	3	393.333	101.036	25,69
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	3	287.500	76.035	26,45
	K (Tanpa Kurkumin)	3	411.667	22.407	5,44
5	P1 (Dosis Kurkumin 5 ppm)	3	228.333	44.464	19,47
	P2 (Dosis Kurkumin 25 ppm)	3	213.333	55.920	26,21
	P3 (Dosis Kurkumin 50 ppm)	3	281.667	12.829	4,55
	K (Tanpa Kurkumin)	3	477.500	58.790	12,31
<b>Jumlah Data</b>		<b>60</b>	<b>Rata-rata % Standar Deviasi</b>		<b>14,55</b>



**Gambar 4.10** Grafik *Boxplot* jumlah sel limfosit

Tabel 4.3 dan Gambar 4.10 di atas menunjukkan data jumlah sel limfosit memiliki sebaran data atau standar deviasi yang cenderung besar (rata-rata 14,55 %) dan nilai mediannya tidak berada di tengah kotak *boxplot*. Untuk memastikan apakah sebaran data mempunyai sebaran normal atau tidak maka harus dilakukan uji normalitas.

Data yang mempunyai sebaran normal dapat dianggap sebagai data yang berdistribusi normal dan mewakili populasi. Distribusi normal merupakan salah satu syarat dilakukannya *parametric-test* seperti uji ANOVA satu arah. Pada penelitian ini uji normalitas dilakukan berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov. Uji Kolmogorov-Smirnov merupakan pengujian normalitas yang banyak dipakai, terutama setelah adanya banyak program statistik yang beredar. Konsep dasar dari uji normalitas Kolmogorov-Smirnov adalah dengan membandingkan distribusi data (yang akan diuji normalitasnya) dengan distribusi normal baku. Penerapan pada uji Kolmogorov-Smirnov adalah bahwa jika signifikansi di bawah 0,05 berarti data yang akan diuji mempunyai perbedaan yang signifikan dengan data normal baku, berarti data tersebut tidak normal. Lebih lanjut, jika signifikansi di atas 0,05 maka berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara data yang akan diuji dengan data normal baku, artinya data yang kita uji normal tidak berbeda dengan normal baku.



**Tabel 4.4** Hasil uji normalitas jumlah sel limfosit

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Jumlah limfosit
N		60
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	3.78833E5
	Std. Deviation	1.530920E5
Most Extreme Differences	Absolute	.136
	Positive	.136
	Negative	-.075
Kolmogorov-Smirnov Z		1.050
Asymp. Sig. (2-tailed)		.220

Dari hasil pengujian normalitas data (Tabel 4.4), ternyata data tersebut nilai signifikansinya  $0,220 > 0,05$  berarti data jumlah limfosit adalah berdistribusi normal. Data hasil uji proliferasi limfosit yang berdistribusi normal dapat dilanjutkan untuk uji beda dengan ANOVA satu arah.

Secara aplikatif, uji ANOVA satu arah digunakan untuk menguji perbedaan tiga kelompok atau lebih berdasarkan satu variable independen. Pada penelitian ini variable independennya adalah Jumlah Sel Limfosit.

Hipotesis yang digunakan dalam tes ANOVA satu arah:

Hipotesis uji :

Ho :  $K = P1=P2=P3$ ,

Ha : Salah satu ada yang berbeda.

Kriteria pengujian :

Ho ditolak jika nilai  $p$  yang diperoleh kurang dari taraf signifikansi  $\alpha = 0,05$  (5%).

Ho di terima jika nilai  $p$  yang diperoleh lebih dari taraf signifikansi  $\alpha = 0,05$  (5%). Dari hasil Uji ANOVA satu arah (Tabel 4.4.), menunjukkan bahwa nilai sig. adalah 0.000 dengan demikian dapat disimpulkan Ho ditolak karena nilai signifikansinya  $p = 0,000 < \alpha = 0,05$ . Hal ini berarti pada penelitian ini terdapat perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan.

**Tabel 4.5** Hasil uji ANOVA satu arah jumlah sel limfosit

ANOVA

Jumlah limfosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.948E11	3	1.983E11	14.090	.000
Within Groups	7.880E11	56	1.407E10		
Total	1.383E12	59			

Hasil Uji ANOVA satu arah hanya menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan yang dilakukan dalam uji proliferasi limfosit. Untuk mengetahui kelompok perlakuan yang mana yang berbeda perlu dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan*.

Pada penelitian ini digunakan uji *Post Hoc Duncan* dikarenakan uji ini lebih teliti dan dapat digunakan untuk membandingkan pengaruh perlakuan dengan perlakuan yang besar. Melalui uji *Post Hoc Duncan* Perbedaan tiap kelompok perlakuan dapat dilihat dari nilai *harmonic mean* yang dihasilkan tiap kelompok yang berada dalam kolom subset yang sama atau berbeda.

**Tabel 4.6** Hasil uji *Post Hoc Duncan*

**Jumlah limfosit**

Duncan<sup>a</sup>

dosis	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
25 ug/ml	15	2.84333E5	
50 ug/ml	15	3.41333E5	
5 ug/ml	15	3.43333E5	
K	15		5.46333E5
Sig.		.205	1.000

Dari hasil Uji *Post Hoc Duncan* (Tabel 4.6.) menghasilkan dua subset yang memiliki perbedaan yang signifikan yakni subset 1 terdiri dari kelompok dengan perlakuan kurkumin (P1, P2, P3) dan subset 2 yaitu kelompok tanpa perlakuan kurkumin (K). Hal ini menunjukkan perlakuan kurkumin pada sel limfosit memberikan berpengaruh signifikan terhadap jumlah sel limfosit. Uji ini juga menunjukkan tidak ada perbedaan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah sel limfosit dengan perlakuan dosis kurkumin yang berbeda (5, 25, dan 50 ppm).

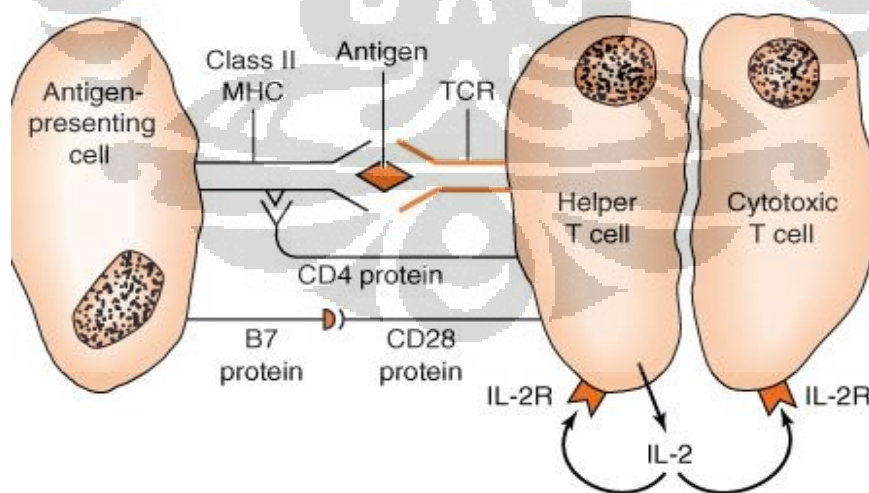
Hal ini berarti besarnya perbedaan %penekanan sel limfosit diantara kelompok perlakuan kurkumin dengan dosis 5, 25, dan 50 ppm yakni 52%, 55%, dan 41% (Gambar 4.6) secara statistik tidak berbeda signifikan.

#### **4.8 Pembahasan Hasil**

Hasil analisis pengaruh dosis kurkumin terhadap %proliferasi sel limfosit dan hasil analisis secara statistik diatas menunjukkan perlakuan kurkumin pada sel limfosit tidak dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit tetapi kurkumin pada penelitian ini menyebabkan penekanan proliferasi pada sel limfosit. Hasil ini berbeda dengan hipotesis awal penelitian ini bahwa perlakuan kurkumin pada sel limfosit akan meningkatkan proliferasi sel limfosit. Hasil ini juga berbeda dengan beberapa penelitian pada senyawa yang terkandung dalam

suatu tanaman yang mempunyai efek imunostimulator seperti polisakarida dalam *Aloe vera*, dan proteoglikan dalam *Ganoderma lucidum*, yang dapat meningkatkan aktivitas limfosit (Tan and Vanitha, 2004). Ekstrak jahe dapat memacu proliferasi limfosit dan menekan limfosit yang mati (Zakaria *et al.*, 1996). Hasil penelitian Miksusanti (2010) minyak atsiri temu kunci dalam berbagai konsentrasi menunjukkan adanya aktivitas proliferasi yang cukup baik terhadap sel limfosit.

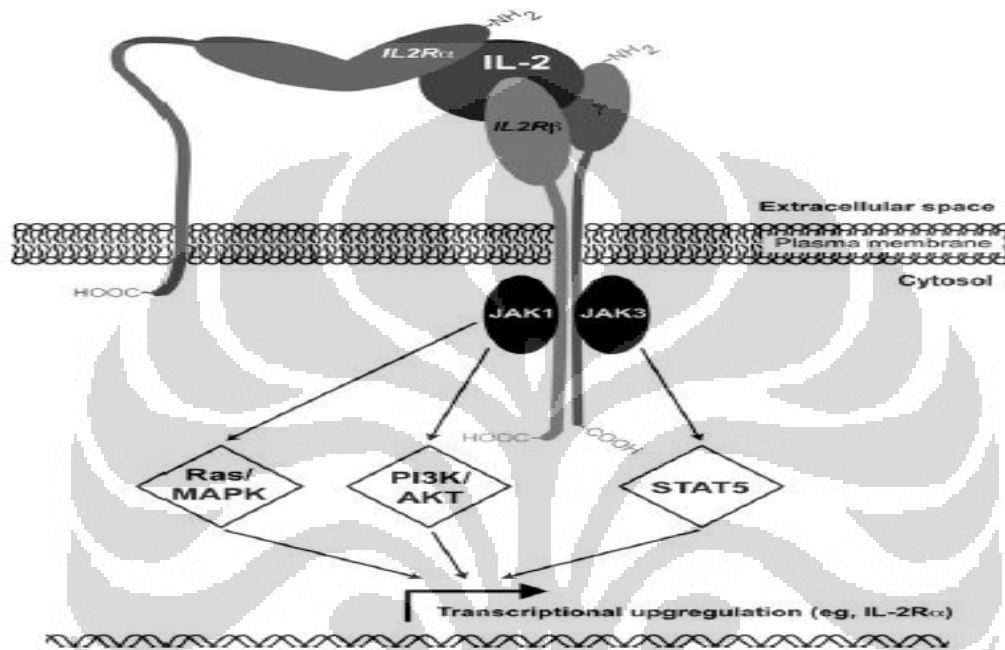
Proliferasi pada sel limfosit dapat dirangsang oleh mediator kimiawi yang berinteraksi dengan reseptor pertumbuhan yang ada di permukaan sel melalui beberapa mekanisme. Mekanisme pertama, proliferasi sel limfosit oleh antigen. Pengikatan antigen pada reseptor permukaan sel T bersama interlukin 1 (IL-1) dari APC (*Antigen Presenting Cell*) (Gambar 4.11) dapat mengaktifasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis fosfatidil inositol bifosfat (PIP<sub>2</sub>) menjadi produk reaktif diasil gliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>). Reaksi tersebut berlangsung dalam membrane plasma. IP<sub>3</sub> kemudian menstimulasi pelepasan Ca<sup>2+</sup> ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca<sup>2+</sup> meningkat. Peningkatan Ca<sup>2+</sup> ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxygenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interlukin -2 (IL-2), IL-2 ini kemudian mengaktifasi sel B maupun sel T untuk berproliferasi (Tejasari, Zakaria, Sayuthi, 2002; Hidenory, et al, 2006).



**Gambar 4.11** Pengikatan antigen pada reseptor permukaan sel T

Mekanisme kedua, proliferasi oleh senyawa IL-2 (Interleukin-2) yang merupakan sitokin yang diproduksi oleh sel T helper. Proliferasi sel limfosit terjadi melalui interaksi IL-2 dengan reseptor IL-2R yang ada di permukaan sel T. Reseptor IL-2R diproduksi setelah

teraktivasi oleh antigen tumor sebagai respon imun sel limfosit terhadap sel tumor. IL-2 akan merangsang proliferasi sel limfosit T melalui pembentukan kompleks dengan reseptor IL-2R. Pembentukan kompleks mengaktifkan *Janus kinase* JAK yang terhubung dengan jalur signal transduksi MAP, AKT, and STAT5 yang kemudian memacu proliferasi sel T seperti pada Gambar 4.12 (Lin and Leonard, 2000; Gaffen, 2001)



**Gambar 4.12** Pembentukan kompleks IL-2 dengan reseptor IL-2R

Mekanisme ketiga, proliferasi sel limfosit oleh senyawa mitogen. Mitogen adalah agen yang mampu menginduksi pembelahan sel, baik sel T maupun sel B dalam persentase yang tinggi, aktivitas mitogen adalah tidak spesifik. Beberapa mitogen, misalnya concanavalin A, akan meningkatkan proliferasi suatu kultur sel limfosit. Concanavalin A yang merupakan suatu lektin mempunyai tempat ikatan spesifik untuk molekul karbohidrat. Limfosit T, diketahui mempunyai molekul karbohidrat yang berfungsi sebagai reseptor lektin. Concanavalin A akan berikatan dengan limfosit T, selanjutnya akan meningkatkan aktivasi protein tirosin kinase, mengaktifkan fosfolipase C, kemudian menghidrolisis PiP<sub>2</sub> menjadi diasil gliserol dan IP<sub>3</sub> yang akan mengaktivasi gen untuk proses mitosis (Wawaimuli, et al., 2005)

Berdasarkan mekanisme proliferasi diatas dapat dijelaskan penyebab kurkumin tidak dapat menyebabkan proliferasi. Kemungkinan pertama adalah kurkumin tidak dapat berperan

sebagai antigen yang dapat menyebabkan proliferasi seperti penelitian Albertus (2000) pada ekstrak cincau hijau yang dapat berperan sebagai antigen menyebabkan proliferasi sel limfosit. Kemungkinan kedua, kurkumin yang diberikan kepada sel limfosit T dari limpa mencit C3H bertumor payudara yang reseptor IL-2R-nya sudah diaktifkan oleh sel tumor payudara pada penelitian ini kemungkinan tidak dapat berinteraksi dengan reseptor IL-2R seperti IL-2 sehingga proliferasi sel limfosit tidak terjadi. Kemungkinan ketiga adalah kurkumin juga tidak dapat berinteraksi seperti interaksi reseptor lektin dengan Concanavalin A.

Hasil ini juga dapat disebabkan oleh kondisi lingkungan yang berinteraksi dengan sel. jika lingkungan yang menyertai sel tidak memberikan kontribusi yang baik maka akan mengakibatkan proliferasi yang tidak optimal bahkan mengalami kematian.



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 KESIMPULAN**

1. Perlakuan dengan kurkumin pada sel limfosit sampai hari ke 5 menyebabkan penekanan pada proliferasi sel limfosit sebesar : Perlakuan kurkumin 5 ppm 52%, Perlakuan kurkumin 25 ppm 55%, dan perlakuan kurkumin 50 ppm 41%
2. Waktu inkubasi yang berpengaruh signifikan terhadap % proliferasi sel limfosit adalah: Perlakuan kurkumin 5 ppm pada hari ke 1, Perlakuan kurkumin 25 ppm pada hari 1, 2, 3, dan 4, dan perlakuan kurkumin 50 ppm pada hari ke 1
3. Hasil analisis statistik dengan uji ANOVA satu arah dan uji *Post Hoc Duncan* menunjukkan tidak ada perbedaan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah sel limfosit dengan perlakuan dosis kurkumin yang berbeda (5,25, dan 50 ppm).

#### **5.2. SARAN**

Untuk menyempurnakan konsep dan pemikiran tentang hubungan aktivitas biologis kurkumin dengan respon imun maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut uji aktivitas kurkumin terhadap komponen respon imun lainnya seperti Makrofag, sel NK, dan lain-lain.

## DAFTAR REFERENSI

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pober, J.S. (1991). *Cellular and molecular immunology*. W.B. Saunders Company: Philadelphia Dion, S.B. (1991). *Effect of hormones on mammary-tumor development from transplanted hyperplastic alveolar nodules in hypophysectomized-ovariectomized-adrenalectomized C3H/CrJ mice*. JNCL, 27, 173-185
- Albertus, S.P.(2000). *Pengaruh aktivitas ekstrak tanaman cincau hijau (Cyclea barbata L. Miens) terhadap proliferasi sel limfosit darah tepi manusia secara in vitro*. [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor; hal: 26-7, 29-30.
- Antony, S., Kuttan, R., & Kuttan, G. (1999). *Immunomodulatory activity of curcumin*. Immunology Invest, 28, 291-303
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S.(1990). *Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses*. Ann Rev Biochem :59;783-836.
- Atal, C.K. (1986). *Role of some important Ayurvedic drugs in modulating the immune system in the human body*. Indian drugs Manufacturer's Association Bulletin, 16:17-30
- Aughey, E., & Frye, F.L.( 2001). *Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates*. London: Iowa State University Press. Hlm 215-226, 250-251
- Baratawidjaja, K. (2004). *Imunologi dasar*. Ed 6. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Becker, W.B.(1986). *The Cell Cycle, DNA, Replication and Mitosis*. In: Becker WB. The World of The Cell. California: The Benjamin/Cumming publ, 441-75
- Commandeur, J.N. and N.P. Vermeulen, (1996). *Cytotoxicity and cytoprotective activities of natural compounds*. The case of curcumin. Xenobiotica 26 : 667 - 680.
- Dickson, R. B., & Lippman, M. E. (1997). *Cancer of The Breast. Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Vincent T. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. Eds; 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 36 : 1541-1616
- Djauzi, S.( 2003). *Perkembangan Imu-nomodulator*. Simposium Peranan Echinacea sebagai imunomodulator dalam Infeksi Virus dan Bakteri
- Ebadi, M. (2002). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. CRC Press, New York, Washington DC.
- Elemkov, I.J., & Chrousos, G.P. (1999). *Stress hormones, Th1/th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and susceptibility to disease*. TEM, 10(9):359-68.
- Gaffen, S.L. (2001). *Signaling domains of the interleukin 2 receptor*. Cytokine 14:63-77

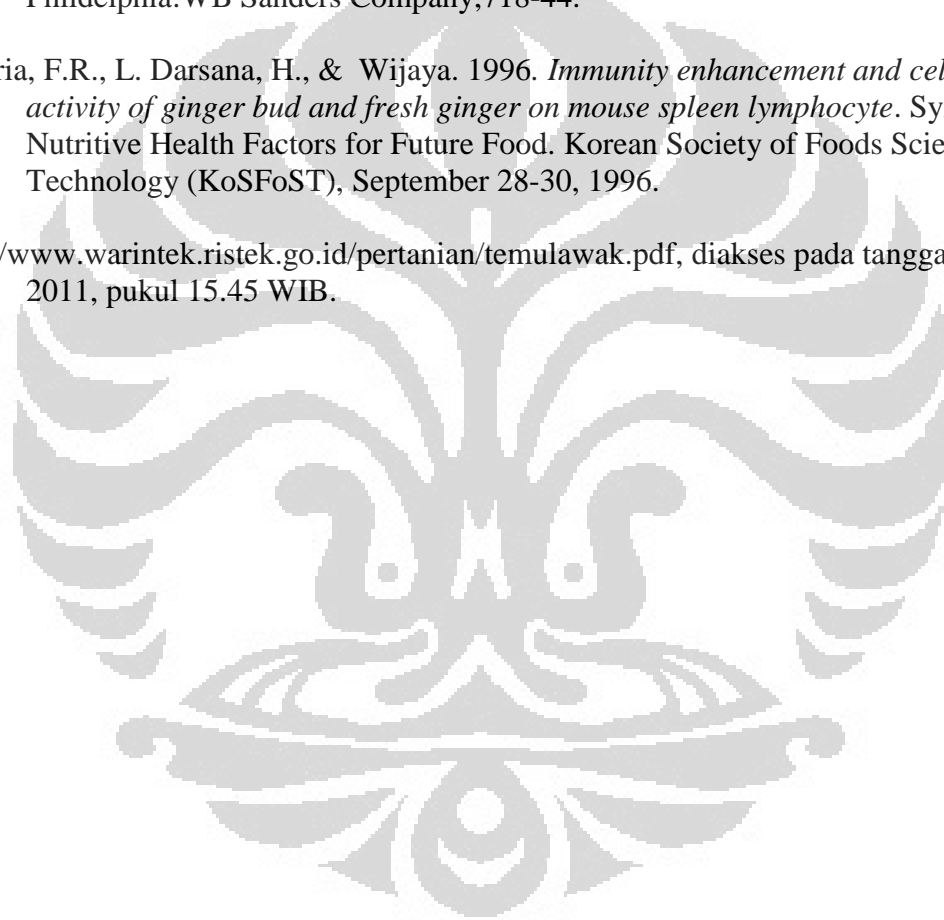


- Gaurisankar, S., and Tanya D. (2008). *Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death*. BioMed Central Cell Division , 3:14
- Gondhowiarjo, S. (2004). Proliferasi Sel dan Keganasan. Maj. Kedakt. Indon. 54(7): 289-299
- Grimm, E., & Loudon, W. (1995). The generation and quantitation of cell-mediated cytotoxicity. Balkwil, F.R. (ed). Cytokines. IRL Press. Oxford, 197-212
- Hercowitz, H.B. (1993). *Immunofisiologi: Fungsi Sel dan Interaksi Selular dalam Pembentukan Antibodi*, Di dalam Bellanti (ed): Imunologi III, Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Hidenory, O., I. Takeshi, O. Teruno, K. Kazumori. (2006). *Activation of lymphocyte proliferation by boronate-containing polymer immobilized on substrate: The effect of boron content on lymphocyte proliferation*. European Cells and Materials 12: 36-43
- Hoffman. (2004). *Progesterone Receptor Antagonists Prevent Carcinogen-Induce Cancer in Rats*, Experimental Oncology, Berlin
- Holan, V., S., Nakamura, & J. Minowada. (1991). *Inhibitory versus stimulatory effects of natural human interferon-alpha on proliferation of lymphocyte Subpopulations*. Immunology, 75:176-181
- Hollman, P.C.H, M.G.L. Hertog and M.B. Katan, (1996). *Analysis and Health Effects of Flavonoids*. Food Chemistry, 57 (1) : 43-46.
- Irmanida, B., Mohamad, R., Latifah, K. D. (2005). *Estimasi kandungan kurkumin pada sediaan herbal komersial secara spektrofotometri derivatif*. Jurnal Sains Kimia Vol 9, No.1, 2005: 28-34
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., & Kelley, R.O. (1997). *Histologi dasar. Ed 8*. Jakarta: EGC, 270-6
- Kaliss, N. (1966). *Transplanted tumor*. Green, L.E (ed). *Biology of laboratory mouse*. McGraw-Hill Book Co. NY, 563-70
- Khasanah, N. (2009). *Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (Nigella sativa) Terhadap Respon Proliferasi Limfosit Limpa Mencit Balb/C yang diinfeksi Salmonella typhimurium*. Skripsi, FK UNDIP, Semarang
- Kintzios, S.E., & Barberaki, M.G. ( 2004). *Plants that Fight Cancer*. CRC Press LLC. New York.
- Kiso. (1985). *Antihepatotoxic Principles of Curcuma Longa Rhizome*. Simposium Nasional Temulawak. UNPAD. Bandung.
- Kleinsmith, L.S., & Kish, V.M. (1988). *The Cell Cycle. Dalam: Principle of Cell Biology*. New York: Harper and Row, 490-533

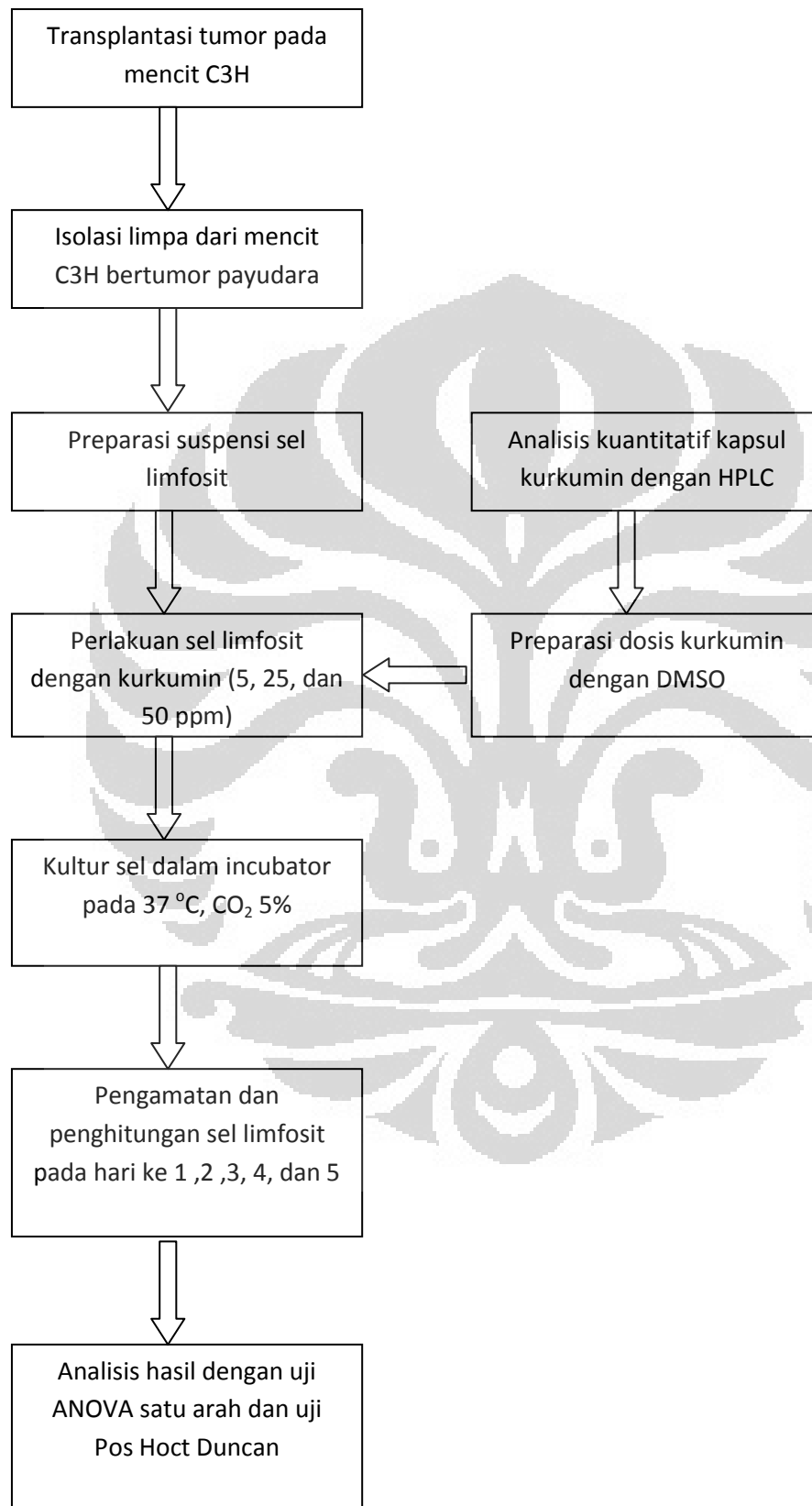
- Lehmann, C., et al. (2000). *Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells*. *Blood*, 594-600
- Lin, J.X., Leonard, W.J. (2000). *The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines*. *Oncogene* 19:2566–2576
- Majeed, M., Badmaev, V., Shirakumar U., and Rajendran, R. (1995). *Curcuminoids antioxidant phytonutrients*, 3-80, NutriScience Publisher Inc., Piscataway, New Jersey
- McKelvey, K.D., & Evans, J.P. (2003). *Cancer Genetics in Primary Care*. *J. Nutr.* 133(11S-D): 3767S-3772S
- Meiyanto, E. (1999). *Kurkumin Sebagai Obat Anti Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 10(4), 224-236.
- Miksusanti .(2010).*Proliferasi Sel Limfosit Secara In Vitro oleh Minyak Atsiri TemuKunci dan Film Edibel Anti Bakteri* .*Jurnal Penelitian Sains Edisi Khusus (C)* 10:06-07
- Mills, S. and Bone, K. (2000). *Principles and Practice of Phytotherapy (Modern Herbal Medicine)*. Churchill Livingstone Edition.
- Moos, P.J., Edes, K., Mullally, J.E., and Fitzpatrick, FA.(2004). *Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells*. *Carcinogenesis*, **25**(9), 1611-1617
- Muhlblock. (1975). *Induction of tumors by hormones*. Metcalf, D. (ed). *A training manual for cancer research workers*. UICC. Geneva, 89-93
- Nafrialdi, & Gan, S. (2000). *Antikanker*. Didalam: *Farmakologi dan Terapi*. FKUI. Jakarta. 668-701
- Nugroho, Y. A., Nuratmi, B., & Suhardi. (2000). *Daya hambat Benalu teh (Scurulla atropur purea BI Danser) terhadap Proliferasi Sel Tumor Kelenjar Susu Mencit (Mus musculus) C3H*. *Cermin Dunia Kedokteran*. Jakarta: PT. Kalbe Farma
- Palupi, R.D. (2006). *Isolasi Asam Usnat dari Tumbuhan Lichen Usnea blepharea Motyka dan Penentuan Aktivitas Anti Kanker*. Tesis FMIPA UI. Jakarta
- Pebriana, R.B., et al. (2008). *Docking Kurkumin dan Senyawa Analognya pada Reseptor Progesteron: Studi Interaksinya Sebagai Selective Progesterone Receptor Modulators (SPRMs)*. *PHARMACON*, Vol. 9, No. 1, Juni 2008, 14–20
- Pande, V., Sharma, R.K., Inoue, J., Otsuka, M., Ramos, M.J.(2003). *A molecular modeling study of inhibitors of nuclear factor kappa-B (p50)-DNA binding*. *J Comput Aided Mol* , 17, 825
- Pereyra, M.L.G. et al.(2005). *Immunomodulating properties of Minthostachys verticillata on human lymphocytes and basophiles*, *Revista Alergia Mexico*, 5(3):105-112

- Raven, & Johnson, G.B. (1986). *The Cell Cycle. In: Biology*. St.Louis:Time Mirror/Mosby College publ, 138-46
- Robbins, S.L., Kumar, V., & Cotran, R.Z. (2007). *Buku Ajar Patologi*. 7thed. Vol I.Jakarta: EGC
- Roitt, I.M. (1991). *Essential immunology*. Blackwell Science Publication. Oxford, xii+356
- Rose, et al. (1994). *DManual of Clinical Laboratory Immunology*. dAmerican Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Sarjadi. (2000). *Patologi Umum dan Sistemik*. 2nd ed. vol 2. Jakarta : EGC.
- Sarjadi, & Trihartini, P. (2001). *Cancer registration in Indonesia*. Asian Pacific J of Cancer Prev ; 2 : 21-3
- Smith, M.R. (1990). *Direct evidence for an intracellular role for TNF*. J. Immunol, 144, 162-165
- Somasundaram, Edmund, N.A., Moore, Small, Shi, Orlowski. (2003). *Dietary Curcumin Inhibits Chemotherapy-induced Apoptosis in Models Of Human Breast Cancer*. diakses dari www.ncbi.nlm.nih.gov 2006
- S.N. Depamede & A. Rosyidi.(2009). *Penghambatan Proliferasi Limfosit Mencit Balb/c oleh Ekstrak Testis Sapi Bali: Peran TGF- $\beta$  Media Peternakan*,hlm. 95-103,Vol. 32 No. 2
- Stites, D.P., Terr, A.I., & Parslow, T.G. (1997). *Medical Immunology 9<sup>th</sup> International Edition* : Appleton & Lange A Simon & Schuster Co, 65-9, 147, 631-7
- Sukara, E. (2000). *Sumber daya alam hayati dan pencarian bahan baku obat (Bioprospekting)*. Prosiding Simposium Nasional II Tumbuhan Obat dan Aromatik. Puslitbang Biologi-LIPI, Bogor : 31-37.
- Tejasari, & F.R., Zakaria. ( 2000). *Sifat fungsional jahe: fraksi 1 dan 2 senyawa bioaktif oleoresin rimpang jahe (Zingiber officinale Roscoe)menurunkan produk peroxidasi lipid membrane sel limfosit secara in vitro*. Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan, Vol II. PATPI, Bogor
- Tonini, G., et al. (1998). *Adjuvant Treatment of Breast Cancer: A Pilot Imunochemoterapy Study with CMF, Interleukin-2 and Interferon alpha*. Cancer Immunol Immnother ,47:157-66
- Varalakshmi, et al. (2008). *Immunomodulatory effects of curcumin: in-vivo*.Int. Immunopharmacol 8(5):688-700.
- Verma, S.P., Goldin, B.R., & Lin, P.S. ( 1998). *The Inhibition of The Estrogen Effects of Pesticides and Enviromental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids*. Environ Health Perspect, 106, **12**: 807–812
- Virginia, K.L., et al. (1993).*Breast cancer*. In: Philip R, Sandra M, Raman Q, editors. *Clinical oncology*. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 187-94

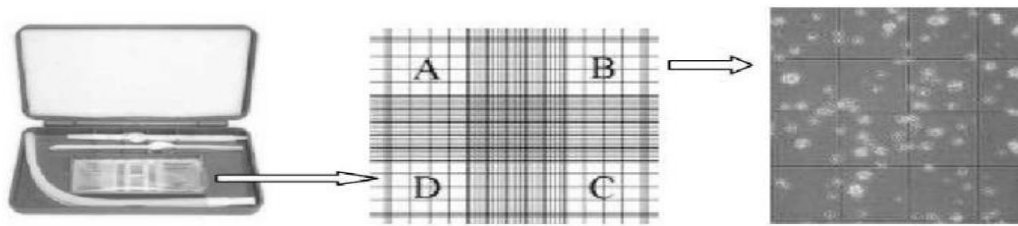
- Wagner, H. (1985). *Immunostimulants from medicinal plants*. In *Advances in Chinese medicinal materials research* (Eds.) H.M. Chang; H.W. Yeung; W.W. Tso and A. Koo. World Scientific Publ. Co. Singa-pura : 159-170.
- Walker, W.A., & Blackburn, G. ( 2004). *Symphosium Introduction: Nutrition and Gene Regulation*. *J. Nutr.* 134(9): 2434S-2436S
- Wawaimuli, A., et al. (2005). *Peningkatan potensi sediaan metil prednisolon palmitat setelah inkorporasi dengan liposom, suatu studi efek antiinflamasi pada kultur splenosit mencit*. *MAKARA, KESEHATAN, VOL. 9, NO. 2: 49-56*
- Whiteside, T.L., & Haberman, R.B. (1990). *Characteristic of Natural Killer Cell and Lymphokine-activated Killer Cell*. In: Oettgen HF Ed. *Human Cancer Immunology*. Phildelphia:WB Sanders Company,718-44.
- Zakaria, F.R., L. Darsana, H., & Wijaya. 1996. *Immunity enhancement and cell protection activity of ginger bud and fresh ginger on mouse spleen lymphocyte*. Symposium Non Nutritive Health Factors for Future Food. Korean Society of Foods Science and Technology (KoSFoST), September 28-30, 1996.
- <http://www.warintek.ristek.go.id/pertanian/temulawak.pdf>, diakses pada tanggal 5 November 2011, pukul 15.45 WIB.



## Lampiran 1. Bagan Kerja



## Lampiran 2. Hasil penghitungan jumlah Limfosit



$$\text{Jumlah sel terhitung / mL} = \frac{\sum \text{ sel kamar A} + \sum \text{ sel kamar B} + \sum \text{ sel kamar C} + \sum \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

4

Hari ke 1

Kelompok P1 dengan Dosis Kurkumin 5 ppm	Kelompok P2 dengan Dosis Kurkumin 25 ppm																																																																																																																																																																		
<table border="1"> <tr><td>4</td><td>6</td><td>3</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>5</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>2</td><td>4</td><td>2</td><td>7</td><td></td><td>4</td><td>6</td><td>10</td><td>4</td></tr> <tr><td>2</td><td>3</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>5</td><td>2</td><td>2</td><td>5</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>3</td><td>2</td><td></td><td>3</td><td>5</td><td>3</td><td>6</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>3</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>3</td><td>4</td><td>1</td><td>6</td></tr> <tr><td>3</td><td>2</td><td>4</td><td>4</td><td></td><td>5</td><td>2</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>4</td><td>5</td><td>3</td><td></td><td>8</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>2</td><td>6</td><td></td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>5</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math>\frac{45 + 67 + 51 + 52}{4} \times 10000</math>                      = 537500</p>	4	6	3	1		1	5	2	4	2	4	2	7		4	6	10	4	2	3	1	1		5	2	2	5	2	2	3	2		3	5	3	6										6	3	1	1		3	4	1	6	3	2	4	4		5	2	0	1	1	4	5	3		8	1	4	2	3	4	2	6		3	3	3	5	<table border="1"> <tr><td>4</td><td>1</td><td>4</td><td>3</td><td></td><td>0</td><td>2</td><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>5</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td></td><td>2</td><td>3</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math>\frac{28 + 24 + 19 + 26}{4} \times 10000</math>                      = 242500</p>	4	1	4	3		0	2	0	2	2	4	1	2		1	1	5	2	1	1	1	2		2	3	2	0	2	0	0	0		1	1	1	1										2	2	2	1		1	2	1	1	1	1	1	1		2	1	1	1	4	1	1	2		1	1	2	1	4	0	1	2		1	1	1	1
4	6	3	1		1	5	2	4																																																																																																																																																											
2	4	2	7		4	6	10	4																																																																																																																																																											
2	3	1	1		5	2	2	5																																																																																																																																																											
2	2	3	2		3	5	3	6																																																																																																																																																											
6	3	1	1		3	4	1	6																																																																																																																																																											
3	2	4	4		5	2	0	1																																																																																																																																																											
1	4	5	3		8	1	4	2																																																																																																																																																											
3	4	2	6		3	3	3	5																																																																																																																																																											
4	1	4	3		0	2	0	2																																																																																																																																																											
2	4	1	2		1	1	5	2																																																																																																																																																											
1	1	1	2		2	3	2	0																																																																																																																																																											
2	0	0	0		1	1	1	1																																																																																																																																																											
2	2	2	1		1	2	1	1																																																																																																																																																											
1	1	1	1		2	1	1	1																																																																																																																																																											
4	1	1	2		1	1	2	1																																																																																																																																																											
4	0	1	2		1	1	1	1																																																																																																																																																											
<table border="1"> <tr><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td>7</td><td></td><td>6</td><td>7</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>2</td><td>6</td><td>3</td><td>5</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>3</td></tr> <tr><td>3</td><td>1</td><td>5</td><td>2</td><td></td><td>2</td><td>4</td><td>2</td><td>6</td></tr> <tr><td>3</td><td>5</td><td>6</td><td>5</td><td></td><td>6</td><td>4</td><td>6</td><td>4</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td></td><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td>1</td></tr> <tr><td>3</td><td>2</td><td>3</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>6</td><td>2</td><td>3</td><td>3</td><td></td><td>3</td><td>3</td><td>1</td><td>4</td></tr> <tr><td>1</td><td>4</td><td>3</td><td>3</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>1</td><td>4</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math>\frac{59 + 68 + 34 + 47}{4} \times 10000</math>                      = 520000</p>	2	1	3	7		6	7	3	4	2	6	3	5		4	4	3	3	3	1	5	2		2	4	2	6	3	5	6	5		6	4	6	4										2	2	3	4		2	1	3	1	3	2	3	3		1	1	0	1	6	2	3	3		3	3	1	4	1	4	3	3		4	4	1	4	<table border="1"> <tr><td>6</td><td>4</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td>4</td><td>1</td><td>3</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>5</td><td>1</td><td>0</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>3</td><td>3</td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>2</td><td>0</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>5</td><td>3</td><td>5</td><td></td><td>4</td><td>3</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>5</td><td>2</td><td>5</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>5</td><td>3</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>3</td><td>4</td><td></td><td>2</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math>\frac{38 + 29 + 26 + 51}{4} \times 10000</math>                      = 360000</p>	6	4	1	3		4	1	3	2	1	3	1	3		1	2	1	2	1	5	1	0		1	1	3	3	3	4	2	0		1	1	2	1										3	5	3	5		4	3	1	2	3	5	2	5		1	2	1	1	0	5	3	1		1	2	1	1	1	3	3	4		2	1	2	1
2	1	3	7		6	7	3	4																																																																																																																																																											
2	6	3	5		4	4	3	3																																																																																																																																																											
3	1	5	2		2	4	2	6																																																																																																																																																											
3	5	6	5		6	4	6	4																																																																																																																																																											
2	2	3	4		2	1	3	1																																																																																																																																																											
3	2	3	3		1	1	0	1																																																																																																																																																											
6	2	3	3		3	3	1	4																																																																																																																																																											
1	4	3	3		4	4	1	4																																																																																																																																																											
6	4	1	3		4	1	3	2																																																																																																																																																											
1	3	1	3		1	2	1	2																																																																																																																																																											
1	5	1	0		1	1	3	3																																																																																																																																																											
3	4	2	0		1	1	2	1																																																																																																																																																											
3	5	3	5		4	3	1	2																																																																																																																																																											
3	5	2	5		1	2	1	1																																																																																																																																																											
0	5	3	1		1	2	1	1																																																																																																																																																											
1	3	3	4		2	1	2	1																																																																																																																																																											
<table border="1"> <tr><td>3</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>3</td><td>4</td><td></td><td>8</td><td>4</td><td>1</td><td>8</td></tr> <tr><td>2</td><td>8</td><td>2</td><td>3</td><td></td><td>2</td><td>9</td><td>5</td><td>3</td></tr> <tr><td>3</td><td>1</td><td>2</td><td>8</td><td></td><td>3</td><td>6</td><td>5</td><td>8</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>6</td><td>6</td><td></td><td>4</td><td>5</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>4</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>0</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>4</td><td>4</td><td></td><td>5</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>5</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>3</td><td>5</td><td>3</td><td>5</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math>\frac{50 + 77 + 53 + 55}{4} \times 10000</math>                      = 587500</p>	3	1	2	4		4	4	3	4	1	3	3	4		8	4	1	8	2	8	2	3		2	9	5	3	3	1	2	8		3	6	5	8										3	4	6	6		4	5	2	4	4	3	3	3		1	0	3	4	1	3	4	4		5	3	3	3	4	5	1	1		3	5	3	5	<table border="1"> <tr><td>5</td><td>1</td><td>2</td><td>0</td><td></td><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>3</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td>0</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td></td><td>2</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>0</td><td>3</td><td></td><td>4</td><td>1</td><td>3</td><td>3</td></tr> <tr><td>0</td><td>3</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math>\frac{20 + 17 + 27 + 22}{4} \times 10000</math>                      = 215000</p>	5	1	2	0		3	2	1	0	0	1	2	1		1	1	3	1	0	2	1	3		1	1	1	0	0	1	1	0		0	0	0	2										2	0	2	1		1	0	1	2	1	1	0	1		2	0	1	2	1	3	0	3		4	1	3	3	0	3	1	3		3	2	1	1
3	1	2	4		4	4	3	4																																																																																																																																																											
1	3	3	4		8	4	1	8																																																																																																																																																											
2	8	2	3		2	9	5	3																																																																																																																																																											
3	1	2	8		3	6	5	8																																																																																																																																																											
3	4	6	6		4	5	2	4																																																																																																																																																											
4	3	3	3		1	0	3	4																																																																																																																																																											
1	3	4	4		5	3	3	3																																																																																																																																																											
4	5	1	1		3	5	3	5																																																																																																																																																											
5	1	2	0		3	2	1	0																																																																																																																																																											
0	1	2	1		1	1	3	1																																																																																																																																																											
0	2	1	3		1	1	1	0																																																																																																																																																											
0	1	1	0		0	0	0	2																																																																																																																																																											
2	0	2	1		1	0	1	2																																																																																																																																																											
1	1	0	1		2	0	1	2																																																																																																																																																											
1	3	0	3		4	1	3	3																																																																																																																																																											
0	3	1	3		3	2	1	1																																																																																																																																																											

Hari ke 1

Kelompok P3 dengan Dosis Kurkumin 50 ppm	Kelompok K Tanpa Kurkumin																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>4</td><td>3</td><td>4</td><td>1</td><td></td><td>3</td><td>4</td><td>6</td><td>5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3</td><td>4</td><td>2</td><td></td><td>3</td><td>6</td><td>3</td><td>7</td></tr> <tr><td>1</td><td>6</td><td>2</td><td>2</td><td></td><td>5</td><td>7</td><td>6</td><td>6</td></tr> <tr><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>4</td><td></td><td>4</td><td>5</td><td>1</td><td>5</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>3</td><td>5</td><td>5</td><td></td><td>7</td><td>5</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>7</td><td>4</td><td>5</td><td>2</td><td></td><td>6</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>6</td><td>2</td><td>6</td><td></td><td>4</td><td>6</td><td>10</td><td>4</td></tr> <tr><td>7</td><td>5</td><td>3</td><td>1</td><td></td><td>2</td><td>3</td><td>2</td><td>2</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{50 + 76 + 58 + 70}{4} \times 10000</math> <b>= 635000</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>3</td><td>6</td><td>6</td><td>6</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>6</td><td>4</td><td>5</td><td></td><td>3</td><td>4</td><td>1</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>4</td><td>4</td><td>2</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>4</td><td>5</td><td>5</td><td>4</td><td></td><td>4</td><td>2</td><td>2</td><td>3</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>1</td><td>4</td><td>5</td><td></td><td>3</td><td>3</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>5</td><td>2</td><td>3</td><td>1</td><td></td><td>2</td><td>0</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>5</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>2</td><td>0</td><td>4</td><td>5</td></tr> <tr><td>5</td><td>4</td><td>3</td><td>4</td><td></td><td>0</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{68 + 35 + 35 + 48}{4} \times 10000</math> <b>= 465000</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>4</td><td>3</td><td>6</td><td>5</td><td></td><td>2</td><td>3</td><td>2</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>1</td><td>3</td><td>4</td><td></td><td>6</td><td>3</td><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>6</td><td>5</td><td>10</td><td></td><td>5</td><td>0</td><td>1</td><td>4</td></tr> <tr><td>4</td><td>2</td><td>6</td><td>2</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>0</td><td>3</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>4</td><td></td><td>2</td><td>4</td><td>4</td><td>3</td></tr> <tr><td>2</td><td>4</td><td>3</td><td>2</td><td></td><td>3</td><td>3</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>6</td><td>6</td><td>5</td><td></td><td>3</td><td>4</td><td>2</td><td>3</td></tr> <tr><td>2</td><td>5</td><td>4</td><td>6</td><td></td><td>6</td><td>4</td><td>6</td><td>2</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{68 + 41 + 52 + 65}{4} \times 10000</math> <b>= 565000</b></p>	4	3	4	1		3	4	6	5	3	3	4	2		3	6	3	7	1	6	2	2		5	7	6	6	4	4	3	4		4	5	1	5										6	3	5	5		7	5	0	1	7	4	5	2		6	2	2	2	3	6	2	6		4	6	10	4	7	5	3	1		2	3	2	2	3	6	6	6		1	1	1	1	0	6	4	5		3	4	1	3	4	4	4	2		1	2	2	4	4	5	5	4		4	2	2	3										3	1	4	5		3	3	2	4	5	2	3	1		2	0	4	2	1	5	1	1		2	0	4	5	5	4	3	4		0	2	1	1	4	3	6	5		2	3	2	2	3	1	3	4		6	3	0	2	4	6	5	10		5	0	1	4	4	2	6	2		4	4	0	3										3	4	5	4		2	4	4	3	2	4	3	2		3	3	1	2	4	6	6	5		3	4	2	3	2	5	4	6		6	4	6	2	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>6</td><td>7</td><td>2</td><td>4</td><td></td><td>8</td><td>4</td><td>4</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>6</td><td></td><td>7</td><td>4</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td>4</td><td>7</td><td>7</td><td>4</td></tr> <tr><td>7</td><td>8</td><td>8</td><td>7</td><td></td><td>7</td><td>4</td><td>4</td><td>4</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td>4</td><td>3</td><td>1</td><td>3</td></tr> <tr><td>1</td><td>4</td><td>5</td><td>4</td><td></td><td>1</td><td>6</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>2</td><td>4</td><td>8</td><td>4</td><td></td><td>8</td><td>4</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>6</td><td>5</td><td>4</td><td>5</td><td></td><td>3</td><td>5</td><td>3</td><td>4</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{76 + 72 + 57 + 63}{4} \times 10000</math> <b>= 670000</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>4</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>6</td><td>4</td><td>4</td><td>6</td></tr> <tr><td>5</td><td>2</td><td>3</td><td>8</td><td></td><td>3</td><td>7</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>4</td><td>7</td><td>4</td><td>2</td><td></td><td>4</td><td>3</td><td>4</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>5</td><td>3</td><td>7</td><td></td><td>5</td><td>6</td><td>4</td><td>4</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td>5</td><td>4</td><td>3</td><td></td><td>6</td><td>7</td><td>7</td><td>1</td></tr> <tr><td>6</td><td>4</td><td>6</td><td>6</td><td></td><td>5</td><td>3</td><td>3</td><td>8</td></tr> <tr><td>7</td><td>6</td><td>9</td><td>6</td><td></td><td>8</td><td>4</td><td>5</td><td>2</td></tr> <tr><td>7</td><td>8</td><td>2</td><td>3</td><td></td><td>2</td><td>7</td><td>3</td><td>6</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{61 + 69 + 77 + 90}{4} \times 10000</math> <b>= 742500</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>7</td><td>6</td><td>6</td><td>8</td><td></td><td>9</td><td>4</td><td>4</td><td>6</td></tr> <tr><td>3</td><td>3</td><td>4</td><td>4</td><td></td><td>6</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>2</td><td>6</td><td>9</td><td>8</td><td></td><td>4</td><td>7</td><td>4</td><td>3</td></tr> <tr><td>3</td><td>3</td><td>6</td><td>4</td><td></td><td>9</td><td>3</td><td>1</td><td>3</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>3</td><td>5</td><td>3</td><td></td><td>2</td><td>1</td><td>6</td><td>6</td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>2</td><td></td><td></td><td>4</td><td>8</td><td>2</td><td>8</td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>6</td><td>2</td><td></td><td>4</td><td>6</td><td>5</td><td>5</td></tr> <tr><td>4</td><td>3</td><td>4</td><td>3</td><td></td><td>4</td><td>3</td><td>2</td><td>4</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{82 + 72 + 70 + 52}{4} \times 10000</math> <b>= 690000</b></p>	6	7	2	4		8	4	4	3	4	4	3	6		7	4	1	0	4	2	1	3		4	7	7	4	7	8	8	7		7	4	4	4										5	3	2	1		4	3	1	3	1	4	5	4		1	6	4	2	2	4	8	4		8	4	4	2	6	5	4	5		3	5	3	4	4	1	1	1		6	4	4	6	5	2	3	8		3	7	2	4	4	7	4	2		4	3	4	3	4	5	3	7		5	6	4	4										8	5	4	3		6	7	7	1	6	4	6	6		5	3	3	8	7	6	9	6		8	4	5	2	7	8	2	3		2	7	3	6	7	6	6	8		9	4	4	6	3	3	4	4		6	2	3	4	2	6	9	8		4	7	4	3	3	3	6	4		9	3	1	3										3	3	5	3		2	1	6	6	3	4	2			4	8	2	8	3	4	6	2		4	6	5	5	4	3	4	3		4	3	2	4
4	3	4	1		3	4	6	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	3	4	2		3	6	3	7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
1	6	2	2		5	7	6	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	4	3	4		4	5	1	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
6	3	5	5		7	5	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
7	4	5	2		6	2	2	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	6	2	6		4	6	10	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
7	5	3	1		2	3	2	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	6	6	6		1	1	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
0	6	4	5		3	4	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	4	4	2		1	2	2	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	5	5	4		4	2	2	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	1	4	5		3	3	2	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
5	2	3	1		2	0	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
1	5	1	1		2	0	4	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
5	4	3	4		0	2	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	3	6	5		2	3	2	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	1	3	4		6	3	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	6	5	10		5	0	1	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	2	6	2		4	4	0	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	4	5	4		2	4	4	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
2	4	3	2		3	3	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	6	6	5		3	4	2	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
2	5	4	6		6	4	6	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
6	7	2	4		8	4	4	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	4	3	6		7	4	1	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	2	1	3		4	7	7	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
7	8	8	7		7	4	4	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
5	3	2	1		4	3	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
1	4	5	4		1	6	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
2	4	8	4		8	4	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
6	5	4	5		3	5	3	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	1	1	1		6	4	4	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
5	2	3	8		3	7	2	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	7	4	2		4	3	4	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	5	3	7		5	6	4	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
8	5	4	3		6	7	7	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
6	4	6	6		5	3	3	8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
7	6	9	6		8	4	5	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
7	8	2	3		2	7	3	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
7	6	6	8		9	4	4	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	3	4	4		6	2	3	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
2	6	9	8		4	7	4	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	3	6	4		9	3	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	3	5	3		2	1	6	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	4	2			4	8	2	8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3	4	6	2		4	6	5	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
4	3	4	3		4	3	2	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															

Hari ke 2

Kelompok P1 dengan Dosis Kurkumin 5 ppm										Kelompok P2 dengan Dosis Kurkumin 25 ppm									
6	2	2	3		2	5	2	4		2	1	0	2		8	4	2	1	
6	5	4	4		4	5	4	2		4	1	2	1		2	3	0	2	
2	2	3	3		2	4	2	4		2	0	0	2		2	3	3	1	
3	2	3	2		4	2	3	0		4	2	4	1		2	0	2	0	
1	2	6	5		1	4	0	4		1	1	2	3		1	1	2	2	
4	5	2	5		5	2	4	4		2	3	1	2		1	4	4	1	
1	1	2	4		1	3	5	4		1	1	0	0		3	2	1	2	
3	0	2	2		3	2	3	1		2	4	1	1		2	1	4	1	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{52 + 49 + 46 + 45}{4} \times 10000 = 480000$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{28 + 35 + 32 + 25}{4} \times 10000 = 300000$									
3	0	3	3		3	2	4	3		0	3	2	3		1	3	0	2	
2	2	2	2		2	2	1	1		3	2	4	2		3	5	1	1	
1	3	1	3		2	4	1	2		2	3	2	2		3	0	1	2	
2	2	2	4		1	1	1	2		4	3	2	1		4	0	0	0	
1	4	2	1		1	2	1	2		2	0	2	0		0	2	0	4	
2	3	3	2		2	4	1	2		0	2	1	1		1	2	1	5	
3	0	4	2		2	4	1	2		0	0	4	2		3	6	2	2	
1	1	2	1		4	1	1	4		2	4	2	1		4	1	2	4	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{35 + 32 + 34 + 32}{4} \times 10000 = 332500$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{38 + 26 + 39 + 23}{4} \times 10000 = 315000$									
5	1	1	2		3	0	0	2		3	1	2	3		1	2	4	2	
1	1	3	1		4	3	0	1		2	1	3	2		2	4	5	0	
1	2	2	0		8	5	1	3		1	2	1	3		4	2	1	4	
3	1	3	3		3	4	1	1		2	1	3	1		0	1	0	1	
1	2	4	1		4	4	0	3		5	0	1	1		0	0	1	1	
4	1	0	2		1	2	0	0		3	2	1	1		1	2	4	0	
6	1	1	4		1	4	3	5		2	1	2	1		0	0	2	3	
4	2	2	3		3	2	1	4		0	0	3	1		2	2	0	4	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{30 + 39 + 37 + 38}{4} \times 10000 = 360000$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{31 + 33 + 22 + 24}{4} \times 10000 = 275000$									



Hari ke 2

Kelompok P3 dengan Dosis Kurkumin 50 ppm	Kelompok K Tanpa Kurkumin																																																																																																																																																																		
<table border="1"> <tr><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td></tr> <tr><td>6</td><td>5</td><td>6</td><td>5</td><td></td><td>3</td><td>5</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td>5</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>1</td><td>0</td><td>2</td><td></td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>1</td><td>2</td><td>2</td><td></td><td>4</td><td>2</td><td>4</td><td>1</td></tr> <tr><td>5</td><td>5</td><td>4</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>5</td><td>1</td></tr> <tr><td>5</td><td>6</td><td>4</td><td>4</td><td></td><td>2</td><td>5</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>4</td><td></td><td>2</td><td>0</td><td>2</td><td>5</td></tr> </table>	3	2	1	3		1	2	4	1	6	5	6	5		3	5	1	2	1	1	2	1		5	0	1	2	4	1	0	2		0	0	1	1										4	1	2	2		4	2	4	1	5	5	4	1		1	2	5	1	5	6	4	4		2	5	2	1	1	4	2	4		2	0	2	5	<table border="1"> <tr><td>4</td><td>4</td><td>4</td><td>6</td><td></td><td>3</td><td>5</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td></td><td>5</td><td>4</td><td>3</td><td>2</td></tr> <tr><td>8</td><td>5</td><td>2</td><td>5</td><td></td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td>5</td></tr> <tr><td>4</td><td>8</td><td>3</td><td>8</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td>6</td><td>5</td><td>5</td><td></td><td>4</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>5</td><td>4</td><td>5</td><td></td><td>5</td><td>1</td><td>5</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>3</td><td>1</td><td>8</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>0</td></tr> <tr><td>5</td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td></td><td>6</td><td>6</td><td>5</td><td>2</td></tr> </table>	4	4	4	6		3	5	1	2	1	4	5	6		5	4	3	2	8	5	2	5		2	4	1	5	4	8	3	8		1	2	1	2										9	6	5	5		4	3	2	1	4	5	4	5		5	1	5	2	4	3	1	8		4	4	3	0	5	4	4	3		6	6	5	2
3	2	1	3		1	2	4	1																																																																																																																																																											
6	5	6	5		3	5	1	2																																																																																																																																																											
1	1	2	1		5	0	1	2																																																																																																																																																											
4	1	0	2		0	0	1	1																																																																																																																																																											
4	1	2	2		4	2	4	1																																																																																																																																																											
5	5	4	1		1	2	5	1																																																																																																																																																											
5	6	4	4		2	5	2	1																																																																																																																																																											
1	4	2	4		2	0	2	5																																																																																																																																																											
4	4	4	6		3	5	1	2																																																																																																																																																											
1	4	5	6		5	4	3	2																																																																																																																																																											
8	5	2	5		2	4	1	5																																																																																																																																																											
4	8	3	8		1	2	1	2																																																																																																																																																											
9	6	5	5		4	3	2	1																																																																																																																																																											
4	5	4	5		5	1	5	2																																																																																																																																																											
4	3	1	8		4	4	3	0																																																																																																																																																											
5	4	4	3		6	6	5	2																																																																																																																																																											
<p>Jumlah sel terhitung/ml =</p> $\frac{43 + 29 + 39 + 54}{4} \times 10000 = 412500$	<p>Jumlah sel terhitung/ml =</p> $\frac{77 + 43 + 53 + 75}{4} \times 10000 = 620000$																																																																																																																																																																		
<table border="1"> <tr><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>2</td><td></td><td>4</td><td>2</td><td>3</td><td>0</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td></td><td>3</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>2</td><td>2</td><td>5</td><td></td><td>3</td><td>4</td><td>6</td><td>2</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>1</td><td>4</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>1</td><td>4</td><td>1</td><td>3</td><td></td><td>3</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>0</td><td>3</td><td>1</td><td>0</td><td></td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>4</td><td></td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>3</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>0</td><td>2</td><td></td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td></tr> </table>	4	2	1	2		4	2	3	0	2	2	2	2		3	0	1	1	4	2	2	5		3	4	6	2	0	0	0	4		4	4	1	4										1	4	1	3		3	1	2	4	0	3	1	0		2	1	1	1	0	1	1	4		2	1	1	3	2	2	0	2		2	2	2	2	<table border="1"> <tr><td>4</td><td>6</td><td>4</td><td>8</td><td></td><td>5</td><td>2</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>6</td><td>4</td><td>1</td><td></td><td>6</td><td>6</td><td>8</td><td>5</td></tr> <tr><td>6</td><td>3</td><td>2</td><td>2</td><td></td><td>1</td><td>6</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td>4</td><td>5</td><td>1</td><td>6</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>1</td><td>6</td><td>4</td><td>4</td><td></td><td>8</td><td>4</td><td>4</td><td>6</td></tr> <tr><td>6</td><td>2</td><td>4</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>6</td><td>8</td><td>4</td></tr> <tr><td>6</td><td>4</td><td>4</td><td>4</td><td></td><td>6</td><td>4</td><td>7</td><td>6</td></tr> <tr><td>3</td><td>1</td><td>1</td><td>7</td><td></td><td>8</td><td>2</td><td>4</td><td>2</td></tr> </table>	4	6	4	8		5	2	4	2	4	6	4	1		6	6	8	5	6	3	2	2		1	6	4	2	4	3	2	1		4	5	1	6										1	6	4	4		8	4	4	6	6	2	4	3		1	6	8	4	6	4	4	4		6	4	7	6	3	1	1	7		8	2	4	2
4	2	1	2		4	2	3	0																																																																																																																																																											
2	2	2	2		3	0	1	1																																																																																																																																																											
4	2	2	5		3	4	6	2																																																																																																																																																											
0	0	0	4		4	4	1	4																																																																																																																																																											
1	4	1	3		3	1	2	4																																																																																																																																																											
0	3	1	0		2	1	1	1																																																																																																																																																											
0	1	1	4		2	1	1	3																																																																																																																																																											
2	2	0	2		2	2	2	2																																																																																																																																																											
4	6	4	8		5	2	4	2																																																																																																																																																											
4	6	4	1		6	6	8	5																																																																																																																																																											
6	3	2	2		1	6	4	2																																																																																																																																																											
4	3	2	1		4	5	1	6																																																																																																																																																											
1	6	4	4		8	4	4	6																																																																																																																																																											
6	2	4	3		1	6	8	4																																																																																																																																																											
6	4	4	4		6	4	7	6																																																																																																																																																											
3	1	1	7		8	2	4	2																																																																																																																																																											
<p>Jumlah sel terhitung/ml =</p> $\frac{34 + 42 + 30 + 25}{4} \times 10000 = 327500$	<p>Jumlah sel terhitung/ml =</p> $\frac{60 + 67 + 80 + 60}{4} \times 10000 = 667500$																																																																																																																																																																		
<table border="1"> <tr><td>1</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td></td><td>1</td><td>6</td><td>6</td><td>5</td></tr> <tr><td>5</td><td>0</td><td>0</td><td>3</td><td></td><td>2</td><td>8</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td></td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>0</td><td>2</td><td></td><td>2</td><td>5</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>0</td><td>3</td><td></td><td>6</td><td>10</td><td>2</td><td>5</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>3</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>4</td><td>1</td><td>5</td><td>3</td></tr> </table>	1	2	2	2		1	6	6	5	5	0	0	3		2	8	3	4	2	2	1	4		2	3	4	2	1	3	0	2		2	5	2	1										3	4	0	3		6	10	2	5	1	2	3	3		1	3	2	4	3	2	1	4		4	4	3	2	4	2	1	1		4	1	5	3	<table border="1"> <tr><td>3</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td></td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>3</td><td>4</td><td></td><td>8</td><td>4</td><td>1</td><td>8</td></tr> <tr><td>2</td><td>8</td><td>2</td><td>3</td><td></td><td>2</td><td>9</td><td>5</td><td>3</td></tr> <tr><td>3</td><td>1</td><td>2</td><td>8</td><td></td><td>3</td><td>6</td><td>5</td><td>8</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td>4</td><td>6</td><td>6</td><td></td><td>4</td><td>5</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>4</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td></td><td>1</td><td>0</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>4</td><td>4</td><td></td><td>5</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>5</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>3</td><td>5</td><td>3</td><td>5</td></tr> </table>	3	1	2	4		4	4	3	4	1	3	3	4		8	4	1	8	2	8	2	3		2	9	5	3	3	1	2	8		3	6	5	8										3	4	6	6		4	5	2	4	4	3	3	3		1	0	3	4	1	3	4	4		5	3	3	3	4	5	1	1		3	5	3	5
1	2	2	2		1	6	6	5																																																																																																																																																											
5	0	0	3		2	8	3	4																																																																																																																																																											
2	2	1	4		2	3	4	2																																																																																																																																																											
1	3	0	2		2	5	2	1																																																																																																																																																											
3	4	0	3		6	10	2	5																																																																																																																																																											
1	2	3	3		1	3	2	4																																																																																																																																																											
3	2	1	4		4	4	3	2																																																																																																																																																											
4	2	1	1		4	1	5	3																																																																																																																																																											
3	1	2	4		4	4	3	4																																																																																																																																																											
1	3	3	4		8	4	1	8																																																																																																																																																											
2	8	2	3		2	9	5	3																																																																																																																																																											
3	1	2	8		3	6	5	8																																																																																																																																																											
3	4	6	6		4	5	2	4																																																																																																																																																											
4	3	3	3		1	0	3	4																																																																																																																																																											
1	3	4	4		5	3	3	3																																																																																																																																																											
4	5	1	1		3	5	3	5																																																																																																																																																											
<p>Jumlah sel terhitung/ml =</p> $\frac{30 + 56 + 59 + 37}{4} \times 10000 = 455000$	<p>Jumlah sel terhitung/ml =</p> $\frac{50 + 77 + 53 + 55}{4} \times 10000 = 587500$																																																																																																																																																																		

Hari ke 3

Kelompok P1 dengan Dosis Kurkumin 5 ppm										Kelompok P2 dengan Dosis Kurkumin 25 ppm									
4	4	2	0		1	2	2	0		4	3	5	0		1	1	0	4	
2	5	2	1		2	2	2	1		1	1	4	2		1	4	2	1	
8	2	3	0		1	0	0	0		2	0	1	4		1	3	2	1	
2	2	1	0		4	0	1	0		0	2	0	2		1	0	0	0	
2	1	1	2		4	1	1	3		0	2	4	4		0	5	0	0	
1	2	0	1		4	2	2	1		0	5	4	0		1	0	0	1	
3	1	3	2		9	2	2	3		0	0	2	0		0	0	4	1	
4	1	0	1		2	2	1	2		1	3	0	0		1	1	0	0	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{38 + 18 + 41 + 25}{4} \times 10000 = 305000$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{31 + 22 + 14 + 25}{4} \times 10000 = 230000$									
3	1	4	2		0	2	0	1		1	0	1	0		0	0	0	2	
4	1	3	2		2	2	1	2		0	1	1	2		0	0	5	4	
2	4	4	4		0	1	2	5		0	1	1	4		2	2	0	0	
2	2	1	2		0	2	1	1		0	0	0	1		1	0	0	2	
0	1	3	2		3	3	2	3		5	5	1	0		1	0	4	2	
1	1	2	1		3	0	0	2		5	5	0	0		0	1	1	0	
0	1	2	0		3	2	1	5		0	5	5	0		1	0	0	0	
3	0	0	1		2	2	4	2		0	0	0	0		0	5	4		
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{41 + 22 + 37 + 18}{4} \times 10000 = 295000$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{13 + 18 + 19 + 31}{4} \times 10000 = 202500$									
0	0	1	1		1	4	0	1		1	0	4	0		0	0	1	0	
1	1	1	3		0	0	0	2		2	0	0	2		0	0	2	0	
2	4	1	0		8	1	4	3		0	0	0	0		0	0	0	0	
0	0	1	1		0	0	0	1		0	0	0	2		0	0	0	0	
1	1	1	0		1	1	0	0		15	8	8	12		0	1	4	8	
2	4	2	2		8	8	8	0		1	4	10	12		1	4	2	8	
1	2	1	0		8	8	0	0		0	2	0	0		0	0	0	2	
0	1	1	1		8	8	0	8		2	0	0	2		0	0	0	0	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{17 + 25 + 66 + 20}{4} \times 10000 = 320000$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{11 + 3 + 30 + 76}{4} \times 10000 = 300000$									

Hari ke 3

Kelompok P3 dengan Dosis Kurkumin 50 ppm								Kelompok K Tanpa Kurkumin									
0	1	0	0		1	0	0	0	4	2	4	2		0	8	4	0
0	0	3	1		0	0	0	8	2	6	2	5		8	2	0	0
1	2	1	0		8	1	0	0	0	0	0	0		4	2	10	0
0	0	0	0		2	1	0	0	4	2	4	1		7	10	1	0
1	0	0	0		0	1	0	0	6	4	2	1		0	6	4	1
8	0	0	0		0	0	0	1	4	0	2	8		8	0	8	1
1	0	0	8		0	0	1	1	0	1	4	2		4	4	1	0
0	0	0	8		0	1	0	0	2	1	8	2		0	6	0	0
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{9 + 21 + 5 + 26}{4} \times 10000 = 152500$								Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{38 + 56 + 43 + 47}{4} \times 10000 = 460000$									
1	2	0	2		1	1	2	2	10	0	10	10		0	0	0	0
0	2	0	1		1	0	1	1	10	0	0	10		0	0	10	10
1	0	3	1		0	1	0	0	0	0	0	10		0	10	10	0
0	0	0	0		0	1	0	1	0	0	0	0		0	0	15	0
0	0	8	8		0	0	4	0	0	0	10	10		10	10	10	10
1	1	1	1		1	2	1	0	0	0	0	0		0	0	0	0
1	0	0	4		4	0	4	0	10	0	0	10		0	0	0	0
3	10	1	3		1	0	2	0	10	0	10	0		0	0	0	0
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{13 + 12 + 19 + 42}{4} \times 10000 = 215000$								Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{60 + 55 + 40 + 60}{4} \times 10000 = 537500$									
10	1	1	0		1	1	0	0	4	2	4	2		2	6	3	4
3	2	2	0		0	0	0	0	1	3	2	4		0	1	6	4
0	0	1	0		1	0	1	0	2	1	4	6		4	1	1	1
8	8	0	1		0	0	1	0	4	1	3	2		8	4	1	8
1	0	0	0		1	0	0	0	3	7	7	5		5	4	4	4
1	0	3	4		0	0	2	2	7	1	4			4	5	5	2
4	1	1	2		0	1	0	1	5	1	4	3		5	2	4	2
2	0	1	4		0	0	0	1	4	1	4	0		3	4	2	5
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{37 + 5 + 8 + 24}{4} \times 10000 = 185000$								Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{45 + 54 + 60 + 56}{4} \times 10000 = 537500$									

Hari ke 4

Kelompok P1 dengan Dosis Kurkumin 5 ppm	Kelompok P2 dengan Dosis Kurkumin 25 ppm																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>3</td><td>1</td><td>5</td><td>0</td><td>1</td><td>8</td><td>3</td><td>1</td></tr> <tr><td>8</td><td>1</td><td>2</td><td>0</td><td>2</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>3</td></tr> <tr><td>0</td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td>3</td><td>0</td><td>2</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>3</td></tr> <tr><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td>1</td><td>3</td></tr> <tr><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>3</td><td>2</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{36 + 24 + 28 + 25}{4} \times 10000</math> <b>= 282500</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>8</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>2</td><td>0</td><td>2</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>2</td><td>2</td><td>4</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td>2</td><td>0</td><td>2</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>4</td><td>0</td><td>5</td><td>4</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>2</td><td>4</td><td>0</td><td>4</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>5</td><td>5</td><td>1</td><td>4</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{24 + 18 + 28 + 26}{4} \times 10000</math> <b>= 240000</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>0</td><td>5</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>4</td><td>5</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>0</td><td>4</td><td>2</td><td>2</td><td>4</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1</td><td>0</td><td>4</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>4</td></tr> <tr><td>4</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{26 + 4 + 32 + 20}{4} \times 10000</math> <b>= 205000</b></p>	3	1	5	0	1	8	3	1	8	1	2	0	2	0	1	1	1	1	2	1	0	0	1	3	0	4	4	3	0	1	2	0									3	0	2	3	3	3	2	1	0	1	1	2	1	1	0	3	2	1	1	2	1	3	1	3	2	1	3	1	0	1	3	2	0	0	0	0	1	1	1	1	4	3	0	1	0	1	8	2	4	2	0	2	0	1	2	0	0	2	2	4	0	0	0	0									2	0	2	1	0	0	0	0	4	0	5	4	0	0	1	2	0	1	2	4	2	4	0	4	0	0	0	1	5	5	1	4	0	1	1	0	0	1	0	1	4	0	5	0	0	1	0	0	2	2	3	4	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0									0	0	1	2	4	5	4	2	0	4	2	2	4	0	1	2	1	0	4	0	0	1	1	4	4	0	0	0	0	0	0	4	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>10</td><td>10</td><td>10</td></tr> <tr><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>10</td><td>10</td></tr> <tr><td>1</td><td>0</td><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>10</td><td>5</td><td>4</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>10</td><td>0</td><td>10</td><td>10</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{13 + 50 + 51 + 0}{4} \times 10000</math> <b>= 285000</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>4</td><td>3</td><td>4</td><td>3</td><td>4</td><td>2</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>0</td><td>2</td><td>4</td><td>2</td><td>3</td><td>8</td><td>6</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>3</td><td>2</td><td>8</td><td>6</td><td>4</td><td>1</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>3</td><td>5</td><td>4</td><td>5</td><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td>4</td><td>4</td><td>2</td><td>4</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>3</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>2</td><td>4</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>2</td><td>4</td><td>4</td><td>1</td><td>4</td><td>2</td><td>5</td><td>5</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{45 + 61 + 44 + 44}{4} \times 10000</math> <b>= 485000</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>5</td><td>1</td><td>2</td><td>5</td><td>0</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td></tr> <tr><td>4</td><td>6</td><td>1</td><td>4</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>5</td><td>1</td><td>4</td><td>3</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td>3</td><td>6</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td><td>3</td><td>7</td><td>4</td></tr> <tr><td>2</td><td>1</td><td>6</td><td>4</td><td>5</td><td>3</td><td>4</td><td>6</td></tr> <tr><td>6</td><td>6</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>2</td><td>6</td><td>1</td></tr> <tr><td>1</td><td>2</td><td>1</td><td>5</td><td>3</td><td>0</td><td>6</td><td>0</td></tr> </table> <p>Jumlah sel terhitung/ml =  <math display="block">\frac{49 + 10 + 54 + 51}{4} \times 10000</math> <b>= 410000</b></p>	0	1	0	1	0	10	10	10	0	1	1	0	0	0	10	10	1	0	2	0	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0	0	0									0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	10	5	4	0	0	0	0	10	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4	3	4	2	4	2	4	0	2	4	2	3	8	6	1	3	3	2	8	6	4	1	2	2	3	5	4	5	0	2									4	4	2	4	4	2	1	1	1	3	1	4	2	1	4	2	2	4	2	2	2	3	4	2	2	4	4	1	4	2	5	5	2	1	4	1	1	1	0	0	5	1	2	5	0	3	0	1	4	6	1	4	1	0	1	1	5	1	4	3	1	0	0	0									3	6	3	2	1	3	7	4	2	1	6	4	5	3	4	6	6	6	1	2	3	2	6	1	1	2	1	5	3	0	6	0
3	1	5	0	1	8	3	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
8	1	2	0	2	0	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	1	2	1	0	0	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	4	4	3	0	1	2	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
3	0	2	3	3	3	2	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	1	1	2	1	1	0	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	1	1	2	1	3	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	1	3	1	0	1	3	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	0	0	0	1	1	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	3	0	1	0	1	8	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	2	0	2	0	1	2	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	2	2	4	0	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	0	2	1	0	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	0	5	4	0	0	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	1	2	4	2	4	0	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	0	0	1	5	5	1	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	1	1	0	0	1	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	0	5	0	0	1	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	2	3	4	0	0	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	1	1	1	0	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	0	1	2	4	5	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	4	2	2	4	0	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	0	4	0	0	1	1	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	0	0	0	0	0	0	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	1	0	1	0	10	10	10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	1	1	0	0	0	10	10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	0	2	0	0	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	3	2	0	0	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	0	0	0	0	0	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	0	0	0	0	10	5	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	0	0	0	10	0	10	10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
0	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	3	4	3	4	2	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	0	2	4	2	3	8	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	3	3	2	8	6	4	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	2	3	5	4	5	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	4	2	4	4	2	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	3	1	4	2	1	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	4	2	2	2	3	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	4	4	1	4	2	5	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	1	4	1	1	1	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
5	1	2	5	0	3	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
4	6	1	4	1	0	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
5	1	4	3	1	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
3	6	3	2	1	3	7	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
2	1	6	4	5	3	4	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
6	6	1	2	3	2	6	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
1	2	1	5	3	0	6	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										

Hari ke 4

Kelompok P3 dengan Dosis Kurkumin 50 ppm										Kelompok K Tanpa Kurkumin									
0	2	2	0		0	0	2	1		3	4	2	1		1	5	4	3	
2	4	2	3		2	3	3	2		2	4	1	3		1	2	4	3	
0	3	2	2		0	3	0	1		1	3	2	4		3	2	2	1	
0	4	0	2		1	0	1	2		2	5	0	3		3	4	2	0	
0	2	0	5		0	0	0	3		1	3	2	4		2	4	1	3	
2	4	0	1		2	0	4	0		1	3	2	4		1	3	2	6	
2	2	1	5		0	2	2	1		3	4	2	1		0	4	1	3	
0	0	3	4		4	1	1	0		1	7	2	0		1	4	2	3	
Jumlah sel terhitung/ml = $28 + \frac{21 + 20 + 31}{4} \times 10000$ = 250000										Jumlah sel terhitung/ml = $40 + \frac{40 + 40 + 40}{4} \times 10000$ = 400000									
4	2	2	1		0	1	0	2		6	3	4	2		1	6	3	4	
5	2	0	4		1	3	0	1		4	8	4	2		8	2	3		
1	0	1	3		1	3	0	0		4	2	1	1		4	4	4	2	
1	5	4	5		0	0	2	0		4	8	4	1		2	4	0	6	
7	4	1	4		0	1	4	1		0	1	5	2		3	1	1	4	
1	1	10	7		5	4	3	2		0	5	4	0		1	1	1	1	
1	2	2	2		4	3	2	2		2	2	2	5		4	2	0	4	
4	1	2	3		4	3	2	4		1	1	1	2		2	0	0	1	
Jumlah sel terhitung/ml = $40 + \frac{14 + 44 + 52}{4} \times 10000$ = 375000										Jumlah sel terhitung/ml = $58 + \frac{53 + 26 + 33}{4} \times 10000$ = 425000									
1	3	2	4		0	0	2	1		3	1	2	1		1	2	4	3	
3	2	2	0		1	1	2	3		1	1	4	2		1	3	2	1	
3	1	4	2		0	3	1	1		3	3	2	1		3	2	4	1	
1	1	4	2		1	1	4	2		2	2	2	4		1	3	2	1	
1	1	1	1		0	0	0	0		6	4	2	5		3	2	1	4	
1	2	1	0		3	1	4	2		4	2	1	6		1	2	3	1	
4	2	1	0		0	0	0	0		1	2	4	0		4	3	2	1	
2	4	1	1		1	1	1	1		2	4	6	5		4	3	2	1	
Jumlah sel terhitung/ml = $35 + \frac{23 + 14 + 23}{4} \times 10000$ = 237500										Jumlah sel terhitung/ml = $34 + \frac{34 + 37 + 54}{4} \times 10000$ = 397500									

Hari ke 5

Kelompok P1 dengan Dosis Kurkumin 5 ppm										Kelompok P2 dengan Dosis Kurkumin 25 ppm									
2	2	1	2		0	1	0	0		0	0	0	0		1	0	0	0	
1	1	1	1		1	0	0	0		1	0	1	1		0	1	0	0	
1	2	0	3		2	1	2	0		0	0	1	0		3	1	0	1	
1	1	1	2		1	0	2	3		0	0	2	2		0	1	1	0	
2	2	0	1		0	0	0	0		3	0	0	1		1	2	0	2	
1	1	1	1		3	0	0	0		5	0	1	7		1	1	5	5	
1	5	4	4		1	0	1	2		1	0	0	1		0	2	1	8	
0	1	1	1		1	2	0	1		2	2	0	2		2	1	0	2	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{22 + 13 + 11 + 26}{4} \times 10000 = 180000$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{8 + 9 + 33 + 25}{4} \times 10000 = 187500$									
6	3	1	0		0	0	3	1		1	2	0	2		2	4	2	2	
4	2	6	0		1	1	0			2	1	2	2		2	2	2	4	
3	4	2	3		1	0	1	1		4	1	1	2		5	1	1	1	
3	1	2	0		1	1	1	0		0	2	1	4		2	2	2	4	
3	1	4	3		2	1	0	0		4	4	1	1		2	0	1	2	
3	2	0	1		1	0	3	1		6	2	4	2		1	2	0	1	
2	2	1	0		0	0	1	0		4	0	1	0		0	1	0	1	
2	1	2	2		1	0	3	1		2	2	0	1		0	0	1	0	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{40 + 12 + 14 + 29}{4} \times 10000 = 237500$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{27 + 38 + 12 + 34}{4} \times 10000 = 277500$									
1	2	1	5		3	1	2	3		1	1	5	1		1	1	0	2	
3	0	3	1		2	0	1	4		1	2	0	1		3	0	1	1	
1	3	2	1		0	1	3	2		0	8	2	8		2	0	1	3	
2	0	1	2		2	4	1	3		1	2	1	0		0	5	4	1	
4	2	1	2		2	4	0	1		1	0	0	0		0	0	0	1	
2	0	0	2		1	1	0	2		0	0	0	1		0	0	1	1	
2	1	2	1		1	2	0	1		0	0	0	0		0	0	0	0	
0	2	4	1		1	1	2	2		0	0	0	0		4	1	1	0	
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{28 + 32 + 21 + 26}{4} \times 10000 = 267500$										Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{34 + 25 + 9 + 2}{4} \times 10000 = 175000$									

Hari ke 5

Kelompok P3 dengan Dosis Kurkumin 50 ppm								Kelompok K Tanpa Kurkumin									
1	0	0	1		0	0	0	4	4	2	8	2		1	2	1	2
0	1	0	2		0	0	2	3	0	2	3	1		2	3	3	1
0	0	0	0		0	0	0	1	4		2	5		0	7	3	2
2	0	3	1		0	0	0	0	4	2	12	5		2	0	2	4
12	2	8	8		4	1	0	0	5	5	2	2		3	4	5	3
1	2	2	12		0	0	0	0	5	1	2	0		2	3	1	5
1	0	2	8		2	3	7	6	2	1	8	5		5	1	3	0
1	1	2	1		1	1	2	3	8	5	1	5		6	2	2	4
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{11 + 10 + 30 + 63}{4} \times 10000$ = 285000								Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{56 + 35 + 49 + 57}{4} \times 10000$ = 492500									
0	2	0	1		1	2	2	1	4	8	2	4		3	4	4	1
4	4	0	8		0	5	5	4	8	4	2	1		4	12	5	2
2	0	0	4		5	0	1	0	3	8	4	4		1	3	2	4
10	1	1	10		2	2	2	0	3	3	3	1		2	3	2	1
2	2	0	2		0	0	2	0	1	2	4	1		2	5	2	4
2	2	1	0		5	0	0	0	3	2	5	0		5	4	6	5
1	0	0	2		0	0	1	4	4	2	4	1		1	2	5	2
1	0	1	0		0	0	0	0	3	5	3	3		1	3	1	1
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{47 + 32 + 12 + 16}{4} \times 10000$ = 267500								Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{62 + 53 + 49 + 43}{4} \times 10000$ = 517500									
1	0	3	0		3	0	0	1	2	1	4	1		1	1	0	0
0	0	1	2		1	8	3	1	5	1	2	5		0	3	0	1
2	1	4	6		1	0	1	8	4	6	1	4		1	0	1	1
2	1	2	0		0	3	1	2	5	1	4	3		1	0	0	0
1	2	1	4		3	0	8	0	3	6	3	2		1	3	7	4
2	0	1	2		0	3	3	1	2	1	6	4		5	3	4	6
5	2	5	2		2	3	1	2	6	6	1	2		3	2	6	1
1	0	3	0		0	1	0	1	1	2	1	5		3	0	6	0
Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{25 + 33 + 28 + 31}{4} \times 10000$ = 292500								Jumlah sel terhitung/ml = $\frac{49 + 10 + 54 + 51}{4} \times 10000$ = 410000									

Lampiran 3. Hasil rata-rata jumlah sel limfosit

Proliferasi Limfosit						Jumlah limfosit	
hari ke- 1	dosis	5 ppm	1			537500.000	
			2			520000.000	
			3			587500.000	
				Total	Mean		5.483333E5
					Std. Deviation		3.502975E4
	25 ppm	1				242500.000	
		2				360000.000	
		3				215000.000	
				Total	Mean		2.725000E5
					Std. Deviation		7.701461E4
	50 ppm	1				635000.000	
		2				465000.000	
		3				565000.000	
				Total	Mean		5.550000E5
					Std. Deviation		8.544004E4
kontrol	1				670000.000		
	2				742500.000		
	3				695000.000		
			Total	Mean		7.025000E5	
				Std. Deviation		3.682730E4	
			Total	Mean		5.195833E5	
				Std. Deviation		1.709327E5	
2	dosis	5 ppm	1			480000.000	
			2			332500.000	
			3			360000.000	
				Total	Mean		3.908333E5
					Std. Deviation		7.843522E4
	25 ppm	1				300000.000	
		2				315000.000	
		3				275000.000	
				Total	Mean		2.96667E5
					Std. Deviation		2.020726E4
	50 ppm	1				412500.000	
		2				327500.000	
		3				455000.000	
				Total	Mean		3.983333E5
					Std. Deviation		6.491982E4
kontrol	1				620000.000		
	2				667500.000		
	3				587500.000		
			Total	Mean		6.250000E5	
				Std. Deviation		4.023369E4	
			Total	Mean		4.27708E5	
				Std. Deviation		1.347534E5	
3	dosis	5 ppm	1			305000.000	
			2			295000.000	
			3			320000.000	
				Total	Mean		3.06667E5
					Std. Deviation		1.258306E4
	25 ppm	1				230000.000	
		2				207500.000	
		3				300000.000	
				Total	Mean		2.458333E5
					Std. Deviation		4.823985E4
	50 ppm	1				152500.000	
		2				215000.000	
		3				185000.000	
				Total	Mean		1.84167E5
					Std. Deviation		3.125833E4
kontrol	1				460000.000		
	2				537500.000		
	3				547500.000		
			Total	Mean		5.150000E5	
				Std. Deviation		4.789311E4	
			Total	Mean		3.12917E5	
				Std. Deviation		1.339515E5	
4	dosis	5 ppm	1			282500.000	
			2			240000.000	
			3			205000.000	
				Total	Mean		3.881044E4
					Std. Deviation		2.850000E4
	25 ppm	1				285000.000	
		2				485000.000	
		3				410000.000	
				Total	Mean		3.933333E5
					Std. Deviation		1.010363E5
	50 ppm	1				250000.000	
		2				375000.000	
		3				237500.000	
				Total	Mean		2.875000E5
					Std. Deviation		7.603453E4
kontrol	1				400000.000		
	2				437500.000		
	3				397500.000		
			Total	Mean		4.11667E5	
				Std. Deviation		2.240722E4	
			Total	Mean		3.33750E5	
				Std. Deviation		9.354447E4	
5	dosis	5 ppm	1			180000.000	
			2			237500.000	
			3			267500.000	
				Total	Mean		2.283333E5
					Std. Deviation		4.46441E4
	25 ppm	1				187500.000	
		2				277500.000	
		3				175000.000	
				Total	Mean		2.133333E5
					Std. Deviation		5.592033E4
	50 ppm	1				285000.000	
		2				267500.000	
		3				292500.000	
				Total	Mean		2.81667E5
					Std. Deviation		1.262900E4
kontrol	1				505000.000		
	2				517500.000		
	3				410000.000		
			Total	Mean		4.77500E5	
				Std. Deviation		5.878988E4	
			Total	Mean		3.00208E5	
				Std. Deviation		1.171317E5	
Total						3.78833E5	
						1.530920E5	



**Lampiran 4. Hasil analisis statistik penghitungan jumlah sel limfosit**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Jumlah limfosit
N		60
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	3.78833E5
	Std. Deviation	1.530920E5
Most Extreme Differences	Absolute	.136
	Positive	.136
	Negative	-.075
Kolmogorov-Smirnov Z		1.050
Asymp. Sig. (2-tailed)		.220

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**ANOVA**

Jumlah limfosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.948E11	3	1.983E11	14.090	.000
Within Groups	7.880E11	56	1.407E10		
Total	1.383E12	59			

**Jumlah limfosit**

Duncan<sup>a</sup>

dosis	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
25 ug/ml	15	2.84333E5	
50 ug/ml	15	3.41333E5	
5 ug/ml	15	3.43333E5	
kontrol	15		5.46333E5
Sig.		.205	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15,000.

**ANOVA**

Jumlah limfosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.171E11	4	1.043E11	5.939	.000
Within Groups	9.657E11	55	1.756E10		
Total	1.383E12	59			

## Jumlah limfosit

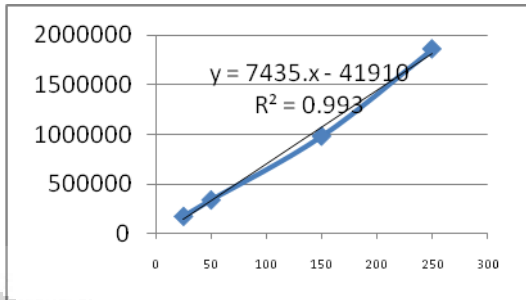
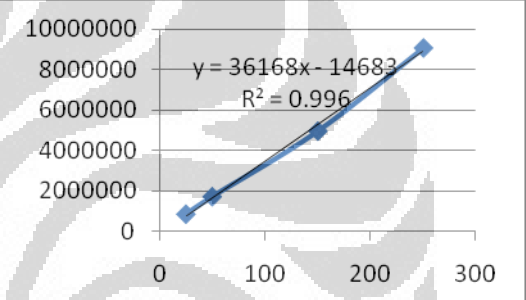
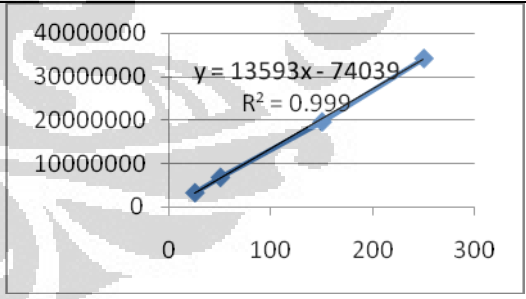
Duncan<sup>a</sup>

hari ke-	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
5	12	3.00208E5		
3	12	3.12917E5		
4	12	3.33750E5	3.33750E5	
2	12		4.27708E5	4.27708E5
1	12			5.19583E5
Sig.		.564	.088	.095

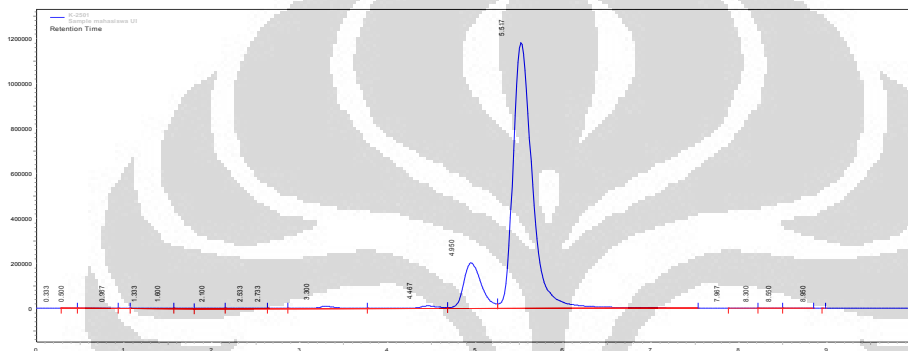
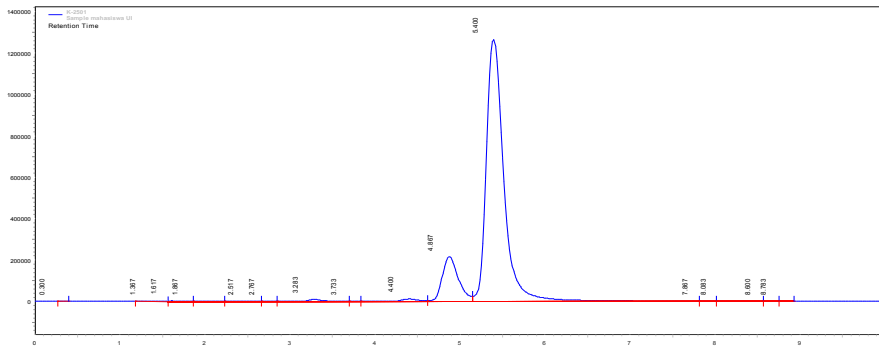
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

**Lampiran 5. Hasil analisis kuantitatif kapsul kurkumin dengan HPLC**

Hasil: Standar Kurkuminoid				
<b>BisDemetoksi</b>				
Konsentrasi (ppm)	RT	Area	%Area	
25	4,08	174.409,5	3,9	
50	4,10	339.948,0	3,62	
150	4,10	821.529,5	3,78	
250	4,01	1.865.115	4,06	
				
<b>Demetoksi</b>				
Konsentrasi (ppm)	Rt	Area	%Area	
25	4,533	851.353	18,39	
50	4,500	1.715.859	18,81	
150	4,567	4.958.194	19,03	
250	4,467	9.066.890	19,67	
				
<b>Kurkumin</b>				
Konsentrasi (ppm)	Rt	Area	%Area	
25	5,033	3.405.716,5	74,14	
50	5,000	6.950.436,5	75,92	
150	5,017	19.678.997,0	75,52	
250	4,967	34.239.901,0	74,67	
				

## Sampel



Kode Sampel	Rt	Area	%Area
Ulangan 1	4.467	165409	0.78
	4.950	2820535	13.36
	5.517	17927661	84.93
Ulangan 2	4.467	165409	0.78
	4.950	2820535	13.36
	5.517	17927661	84.93

**LAPORAN PENGUJIAN**

No. /LAP UJI/LAPTIB/BPPT/XII/2011

1. No. Kontrak : 1101-BF1-1/1
2. Prinsipal :
  - 2.1. Nama : Khairinal
  - 2.2. Alamat : Departemen Kimia FMIPA UI - Jakarta
  - 2.3. Telp./Fax/HP : 083898093065
  - 2.4. Personil penghubung :
3. Barang yang diuji (sampel) :
  - 3.1. Jenis sampel : 1. 1101-BF1-1/1, Serbuk, warna kuning.
  - 3.2. Jumlah sampel : 1(satu) buah
  - 3.3. Jenis pengujian : pengujian kuantitatif kadar bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin, kurkumin dan total kurkuminoid
  - 3.4. Tanggal penerimaan sampel : 29 November 2011
  - 3.5. Tanggal pengujian : 2 Desember 2011
4. Hasil pengujian :
  - 4.1. Metode pengujian : IP 03.2.1.A.1-01.00
  - 4.2. Hasil :

Kode Sampel	Kadar Bisdemetoksi kurkumin (%)	Kadar Demetoksi kurkumin (%)	Kadar Kurkumin (%)	Total Kadar Kurkuminoid (%)
Ulangan 1	0,2545318	3,109247	20,61625	23,980
Ulangan 2	0,221908	3,089594	20,39478	23,706
<b>Rerata</b>	<b>0,238</b>	<b>3,099</b>	<b>20,506</b>	<b>23,843</b>

**Kadar kurkuminoid total dalam sampel serbuk = 23,843 %**

Serpong, 8 Desember 2011

Laboratoria Pengembangan Teknologi  
Industri Agro dan Biomedika (LAPTIB)



Dr. Agung Eru Wibowo, M.Si., Apt  
Manajer Teknis Bidang Farmasi