



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERBANDINGAN EFEKTIVITAS PANGAN DARURAT BPPT
DENGAN EKSTRAK *Phyllanthus niruri* SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN PADA MENCIT YANG TELAH DIBERI
PAJANAN TETANUS TOKSOID**

SKRIPSI

**JESSICA OCTAVIANI
0806 324 053**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
KEDOKTERAN UMUM
JAKARTA
AGUSTUS 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERBANDINGAN EFEKTIVITAS PANGAN DARURAT BPPT
DENGAN EKSTRAK *Phyllanthus niruri* SEBAGAI
IMUNOSTIMULAN PADA MENCIT YANG TELAH DIBERI
PAJANAN TETANUS TOKSOID**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran

**JESSICA OCTAVIANI
0806 324 053**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
KEDOKTERAN UMUM
JAKARTA
AGUSTUS 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Jessica Octaviani
NPM : 0806 324 053
Tanda Tangan :



Tanggal : 11 Agustus 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Jessica Octaviani
NPM : 0806 324 053
Fakultas : Kedokteran
Judul Skripsi : Perbandingan Efektivitas Pangan Darurat BPPT dengan Ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai Imunostimulan pada Mencit yang Telah Diberi Pajanan Tetanus Toksoid

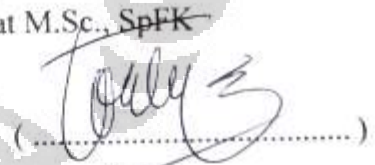
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada program studi Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

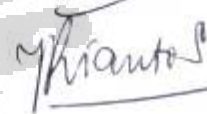
Pembimbing : Dr. Alida Roswita Harahap DMM, SpPK, PhD

()

Narasumber : Prof. Dr. dr. Purwastyastuti Ascobat M.Sc., SpFK

()

Penguji : Prof. Dr. Rianto Setiabudi, SpFK(K)

()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 11 Agustus 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian “Perbandingan Efektivitas Pangan Darurat BPPT dengan Ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai Imunostimulan pada Mencit yang Telah Diberi Pajanan Tetanus Toksoid” tepat pada waktunya. Penelitian ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran pada Program Pendidikan Dokter Umum Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Penulis sangat menyadari berbagai keterbatasan penulis dalam melakukan penelitian ini. Tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, hasil penelitian ini tidak akan tercapai. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Alida Roswita Harahap DMM, SpPK, PhD yang telah meluangkan waktunya dalam membimbing penelitian ini dan mengajarkan berbagai pengetahuan tentang imunologi, pewarnaan sediaan hapus hematologi, dan penghitungan kadar imunoglobulin;
2. Prof. Dr. Dr. Purwastyastuti, Sp.FK yang telah memberikan ide penelitian dan meluangkan waktunya dalam membimbing penelitian ini dan dalam penulisan skripsi (laporan hasil penelitian);
3. Dr. dr. Saptawati Bardosono, MS, SpGK sebagai Ketua Modul Riset FKUI yang telah memberikan izin untuk melaksanakan penelitian ini;
4. *Animal House* FKUI yang telah menyediakan tempat pemeliharaan hewan coba.
5. Pak Arif, Pak Dede, dan Pak Rukmana yang telah membantu penulis dalam merawat hewan coba dan mengambil sampel penelitian;
6. Lembaga Biologi dan Molekuler Eijkman yang telah menyediakan tempat, alat, dan bahan pewarnaan sediaan hapus hematologi dan penghitungan kadar imunoglobulin, serta tempat konsultasi dengan pembimbing;
7. Mba Nia yang telah membantu penulis dalam proses pewarnaan sediaan hapus hematologi;

8. Departemen Farmakologi FKUI yang telah menyediakan tempat pengolahan data dan tempat konsultasi dengan pembimbing, serta buku-buku yang dipakai selama penelitian ini.
9. Mba Lin yang telah mengajarkan SPSS ke penulis;
10. Departemen Histologi FKUI dan Departemen Biologi Kedokteran FKUI yang telah menyediakan tempat dan mikroskop untuk penghitungan jenis leukosit;
11. Keluarga yang telah mendukung penulis, baik dalam segi moral maupun material;
12. Laboratorium Ragunan yang telah membantu penulis dalam pemeriksaan darah lengkap sampel penelitian secara otomatis.
13. Sesama rekan penelitian: Atika, Lina Ninditya, Lingga Sri Muninggar, Natasya Puspita Tanri, dan Sari Purnama Hidayat yang telah melakukan penelitian in bersama dengan penulis;
14. Pihak-pihak lain yang turut membantu penelitian ini.

Akhir kata, penulis sadar bahwa penelitian ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis terbuka menerima kritik dan saran yang membangun. Semoga penelitian ini bermanfaat bagi penelitian selanjutnya.

Jakarta, 11 Agustus 2011

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

nama : Jessica Octaviani
NPM : 0806 324 053
program studi : Kedokteran Umum
fakultas : Kedokteran
jenis karya : Skripsi

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

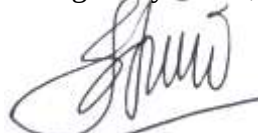
“Perbandingan Efektivitas Pangan Darurat BPPT dengan Ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai Imunostimulan pada Mencit yang Telah Diberi Paparan Tetanus Toksoid”, beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, 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: Jakarta

Pada tanggal: 11 Agustus 2011

Yang menyatakan,



(Jessica Octaviani)

ABSTRAK

Nama : Jessica Octaviani
Program Studi : Kedokteran Umum
Judul : Perbandingan Efektivitas Pangan Darurat BPPT dengan Ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai Imunostimulan pada Mencit yang Telah Diberi Pajanan Tetanus Toksoid

Indonesia sering dilanda bencana sehingga memerlukan pangan darurat yang dapat segera dikonsumsi oleh korban bencana. BPPT membuat pangan darurat yang mudah dikonsumsi, bernutrisi tinggi, dan mengandung ekstrak polifenol buah delima yang diharapkan meningkatkan sistem imun. Efek pangan darurat dibandingkan dengan ekstrak *Phyllanthus niruri*, imunostimulan di pasaran, pada mencit kelaparan yang diberi pajanan tetanus toksoid (TT). Digunakan 30 ekor mencit betina yang dibagi ke dalam dua kelompok perlakuan secara random. Observasi dilakukan sebelum perlakuan (minggu ke-0), ke-4, dan ke-8 setelah perlakuan. Pajanan TT diberikan pada akhir minggu ke-4. Pada minggu-minggu tersebut, enam ekor mencit dari tiap kelompok dikorbankan untuk diambil sampel darahnya dan dihitung jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan IgG spesifik anti-TT. Tidak terdapat perbedaan bermakna pada jumlah dan jenis leukosit (kecuali batang), serta kadar IgG total antarkelompok perlakuan. Terdapat perbedaan bermakna pada jumlah batang dan kadar IgG spesifik anti-TT antarkelompok perlakuan pada minggu ke-8 dengan $p = 0.032$ dan 0.008 , yaitu jumlah batang lebih tinggi pada kelompok uji dan kadar IgG spesifik anti-TT lebih tinggi pada kelompok ekstrak *Phyllanthus niruri*. Dapat disimpulkan bahwa pangan darurat BPPT berefek hampir sama dengan ekstrak *Phyllanthus niruri* terhadap respon imun. Tetapi, pangan darurat lebih meningkatkan jumlah batang dan ekstrak *Phyllanthus niruri* lebih meningkatkan kadar IgG spesifik anti-TT secara signifikan.

Kata kunci: Pangan darurat BPPT, *Phyllanthus niruri*, imunostimulan, tetanus toksoid, jumlah leukosit, jenis leukosit, IgG total, IgG spesifik.

ABSTRACT

Name : Jessica Octaviani
Faculty : Medicine
Title : *Efficacy's Comparison of BPPT's Emergency Food with Phyllanthus niruri Extract as Immune Stimulant in Mice that Being Challenged by Tetanus Toxoid*

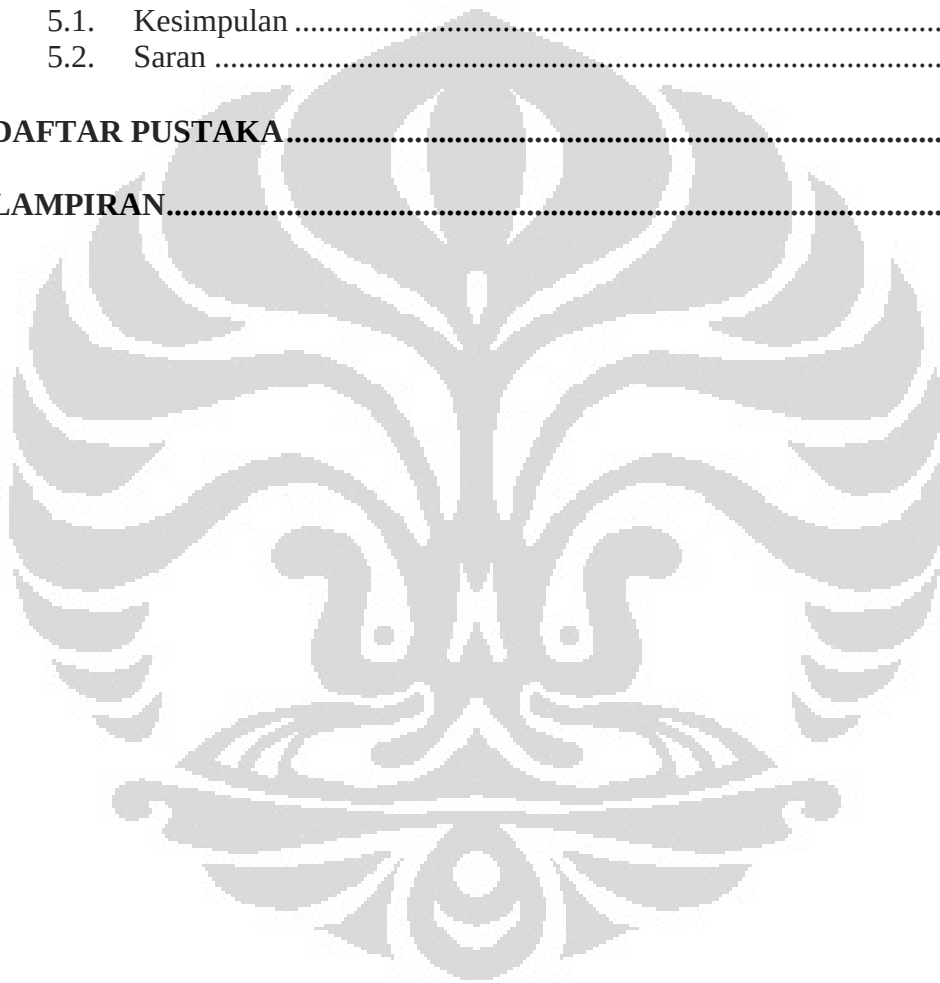
Indonesia is often hit by disasters that require emergency food that can be immediately consumed by disaster victims. BPPT makes emergency food that easily consumed, has high nutrition, and has pomegranate's poliphenol extract that is expected increasing immune system. The effect of BPPT's emergency food is compared with the effect of Phyllanthus niruri extract as immune stimulant on the market to hungry mice that are challenged by tetanus toxoid (TT). Thirty mice are divided randomly into two treatment groups. Mice are observed before treatment (week-0), in the fourth week, and eight week after treatment. TT challenge is given in the end of fourth week. In these weeks, six mice from each group are sacrificed for taking blood samples, counting the amount and differential counts of leukocytes, and the levels of total IgG and antitetanus-toxoid-specific IgG. There is no significant difference in the amount and differential counts of leukocytes (except stab), and the levels of total IgG between two treatment groups. There are significant differences in the amount of stab and antitetanus-toxoid-specific IgG in eighth week with $p = 0.032$ and 0.008 , BPPT's emergency food group reaches higher position in stab and Phyllanthus niruri extract group reaches higher position in antitetanus-toxoid-specific IgG. It can be concluded that the effect of BPPT's emergency food is almost same with the effect of Phyllanthus niruri extract on immune system. But, BPPT's emergency food group reaches higher position in stab and Phyllanthus niruri extract group reaches higher position in antitetanus-toxoid-specific IgG significantly.

Keywords: BPPT's emergency food, Phyllanthus niruri, immune stimulant, tetanus toxoid, amount of leukocytes, differential counts, total IgG, antitetanus-toxoid-specific IgG.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Hipotesis	2
1.4. Tujuan	3
1.4.1. Tujuan Umum	3
1.4.2. Tujuan Khusus	3
1.5. Manfaat	4
1.5.1. Manfaat Bagi Peneliti	4
1.5.2. Manfaat Bagi Perguruan Tinggi.....	4
1.5.3. Manfaat Bagi Masyarakat dan Pemerintah	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Sistem Imun	5
2.1.1. Imunitas Natural (Sistem Imun Nonspesifik)	5
2.1.2. Imunitas Adaptif (Sistem Imun Spesifik)	6
2.2. Immunostimulasi.....	9
2.2.1. Pangan Darurat BPPT	12
2.2.2. <i>Phyllanthus niruri</i>	13
2.3. Tetanus Toksoid.....	13
2.4. Metodologi	15
2.4.1. Metode	15
2.4.2. Hewan Percobaan.....	17
2.4.3. Saat Percobaan	18
2.4.4. Pengukuran Dosis	18
2.4.5. Pemeriksaan Hematologi dan ELISA	19
KERANGKA KONSEP.....	20
3. METODE PENELITIAN.....	21
3.1. Desain Penelitian	21
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.3. Sampel dan Cara Pemilihan Sampel	22
3.4. Identifikasi Variabel.....	22

3.5.	Cara pengambilan Data	22
3.6.	Renacana Manejemen dan Analisis Data	33
3.7.	Definisi Operasional	35
3.8.	Alur Penelitian	36
3.9.	Masalah Etik Penelitian	36
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1.	Parameter Respon Imun	37
4.2.	Data Tambahan	45
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1.	Kesimpulan	48
5.2.	Saran	48
DAFTAR PUSTAKA		50
LAMPIRAN		54

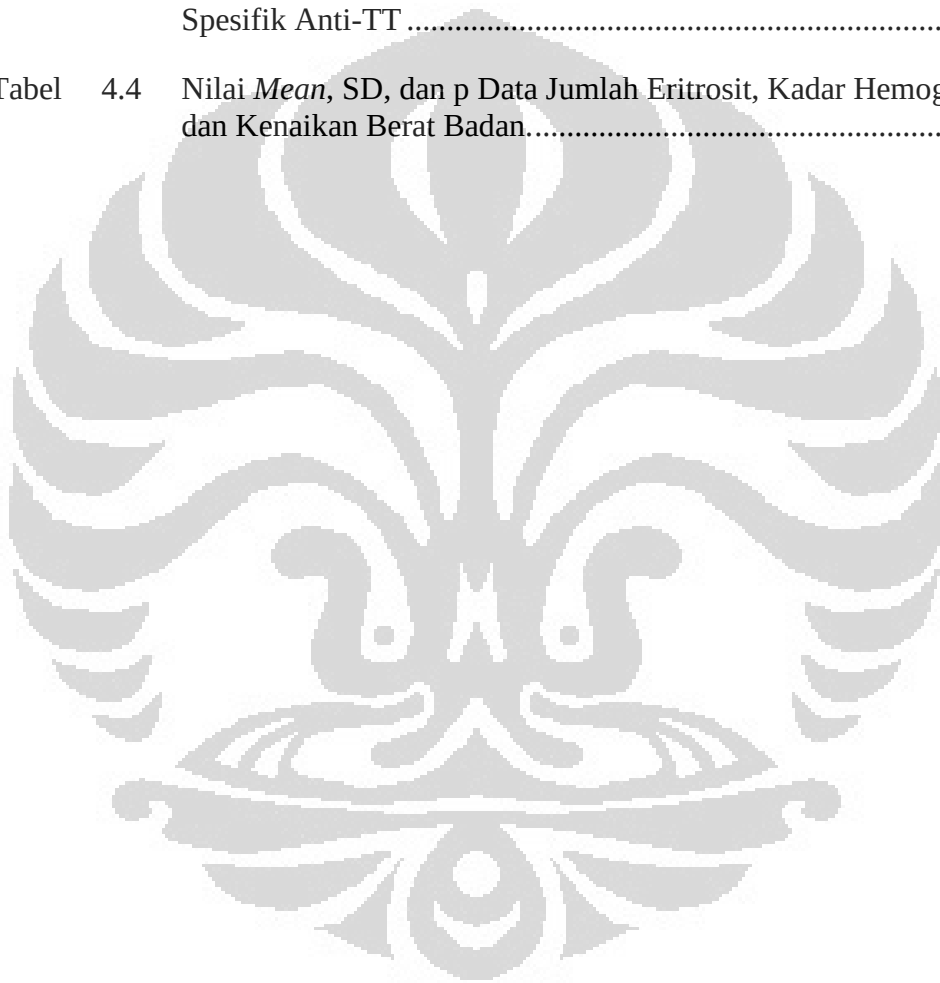


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Komposisi Nutrisi yang Direkomendasikan	10
Gambar 2.2	Mencit Strain BALB-C	17
Gambar 2.3	Kerangka Konsep	20
Gambar 3.1	Kamar Hitung <i>Improved</i> Neubaur.....	26
Gambar 3.2	Cara pembuatan sediaan hapus darah tepi	27
Gambar 3.3	Kurva Standar Hubungan Konsentrasi IgG dengan Densitas Optik pada 450 nm	33
Gambar 3.4	Rencana Manejemen dan Analisis Data	34
Gambar 3.5	Alur Penelitian	36
Gambar 4.1	Jumlah Sel Batang Berdasarkan Minggu Percobaan	39
Gambar 4.2	Jumlah Sel Leukosit Berdasarkan Minggu Percobaan.....	41
Gambar 4.3	Jumlah Sel Limfosit Berdasarkan Minggu Percobaan.....	41
Gambar 4.4	Kadar IgG Spesifik Anti-TT Berdasarkan Minggu Percobaan.....	44
Gambar 4.5	Berat Badan Rata-Rata Berdasarkan Minggu Percobaan.	46

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Hubungan Konsentrasi IgG dengan Densitas Optik pada 450 nm .	32
Tabel 4.1	Nilai <i>Mean</i> , SD, dan p Data Jumlah Basofil, Batang, dan Segmen	37
Tabel 4.2	Nilai Median, Minimum, Maksimum, dan p Data Jumlah Leukosit, Eosinofil, Limfosit, dan Monosit.	40
Tabel 4.3	Nilai <i>Mean</i> , SD, dan p Data Kadar IgG Total dan Kadar IgG Spesifik Anti-TT	43
Tabel 4.4	Nilai <i>Mean</i> , SD, dan p Data Jumlah Eritrosit, Kadar Hemoglobin, dan Kenaikan Berat Badan.....	46



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh pejamu yang dapat mengeliminasi benda asing atau sel abnormal yang berbahaya bagi tubuh.¹ Sistem imun terdiri dari sistem imun spesifik dan nonspesifik.^{1,2} Dengan adanya sistem imun, tubuh tidak selalu menjadi sakit saat terpajan mikroorganisme. Kejadian sakit tubuh akibat pajanan mikroorganisme tergantung pada kadar antimikroorganisme tubuh. Bila tubuh pejamu mempunyai kadar antimikroorganisme yang tinggi terhadap mikroorganisme tersebut, pejamu tidak akan menderita penyakit. Sebaliknya, bila tubuh pejamu mempunyai kadar antimikroorganisme tersebut dalam kadar rendah atau tidak punya sama sekali, terutama pada pejamu anak-anak, pejamu dapat menderita penyakit.²

Berbagai upaya dapat ditempuh untuk meningkatkan kemampuan sistem imun, seperti dengan melakukan imunisasi atau mengusahakan imunopotensiasi.² Imunisasi adalah suatu cara untuk meningkatkan sistem imun tubuh terhadap suatu mikroorganisme penyebab penyakit dengan memasukkan antimikroorganisme yang sesuai atau mikroorganisme tersebut yang telah dilemahkan ke dalam tubuh.³ Imunopotensiasi adalah suatu cara untuk memperbaiki fungsi sistem imun tubuh yang turun dengan menggunakan imunostimulan (perangsang sistem imun).² Imunostimulan dapat meningkatkan sistem imun dengan mengaktifasi sistem komplemen, menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel fagositik (sel granulosit dan sel makrofag), serta menstimulasi pembentukan limfosit melalui pengaruhnya pada organ limfoid primer dan sekunder (limpa dan nodus limfe).⁴

Salah satu suplemen dengan indikasi meningkatkan sistem imun yang ada di pasaran Indonesia adalah Stimuno yang mengandung zat aktif ekstrak *Phyllanthus niruri*.⁵ Pada uji klinis ekstrak *Phyllanthus niruri* pada manusia, ditemukan bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri* dapat meningkatkan kadar IFN- γ , kadar CD4, dan rasio CD4/CD8. Dengan demikian, ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai imunostimulan dapat memberikan efek terhadap respon imun spesifik dan

nonspesifik.⁶

Pada tahun 2009, BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi) Indonesia meneliti untuk membuat pangan darurat yang mudah dikirimkan dan dapat segera dikonsumsi pada keadaan darurat, misalnya keadaan pasca bencana alam. Pangan darurat ini bernutrisi tinggi dan mengandung ekstrak polifenol buah delima yang diharapkan meningkatkan sistem imun korban bencana.⁷ Pangan darurat BPPT memiliki ekstrak polifenol dengan konsentrasi yang jauh lebih tinggi dari yang terkandung di dalam buah delima yang biasa dimakan. Untuk membandingkan efek pangan darurat BPPT dengan imunostimulan yang ada di pasaran Indonesia terhadap sistem imun tubuh, penulis tertarik untuk membuat penelitian berjudul “Perbandingan Efektivitas Pangan Darurat BPPT dengan Ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai Imunostimulan pada Mencit yang Telah Diberi Paparan Tetanus Toksoid”.

1.2. Identifikasi Masalah

1. Bagaimana perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada jumlah leukosit mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi paparan tetanus toksoid?
2. Bagaimana perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada distribusi jenis leukosit mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi paparan tetanus toksoid?
3. Bagaimana perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG total mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi paparan tetanus toksoid?
4. Bagaimana perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG spesifik antitetanus toksoid mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi paparan tetanus toksoid?

1.3. Hipotesis

1. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada jumlah

leukosit mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.

2. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada distribusi jenis leukosit mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.
3. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG total mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.
4. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG spesifik antitetanus toksoid mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.

1.4. Tujuan

1.4.1. Tujuan Umum

Membandingkan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai imunostimulan pada mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.

1.4.2. Tujuan Khusus

- 1 Mengetahui perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada jumlah leukosit mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.
- 2 Mengetahui perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada distribusi jenis leukosit mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.
- 3 Mengetahui perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG total mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.

- 4 Mengatahui perbandingan efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG spesifik antitetanus toksoid mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Bagi Peneliti

1. Memperoleh pengalaman belajar dan pengetahuan dalam menganalisis masalah kesehatan dan melakukan penelitian.
2. Mengembangkan daya nalar, analisis, minat, dan kemampuan dalam bidang penelitian.
3. Mengaplikasikan ilmu tentang penelitian yang didapat selama ini.

1.5.2. Bagi Perguruan Tinggi

1. Sebagai perwujudan Tri Dharma Perguruan Tinggi.
2. Mewujudkan Universitas Indonesia sebagai universitas riset.
3. Sarana dalam menjalin kerjasama antara staf pengajar, mahasiswa, pimpinan fakultas, dan universitas.

1.5.3. Bagi Masyarakat dan Pemerintah

Mencari dan menemukan pangan khusus yang bermanfaat tidak hanya sebagai pangan, tetapi juga dapat meningkatkan sistem imun pada keadaan darurat, misalnya keadaan pasca bencana alam

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sistem Imun

Sistem imun merupakan suatu reaksi tubuh untuk melawan substansi asing yang masuk ke dalam tubuh, seperti mikroorganisme dan molekul besar. Sistem imun dibagi menjadi imunitas natural (*innate immunity*) dan imunitas adaptif (*acquired immunity*). Imunitas natural merupakan pertahanan pertama tubuh untuk melawan agen asing yang sifatnya nonspesifik, termasuk agen penginfeksi, bahan kimia, serta kerusakan jaringan akibat trauma dan terbakar. Setiap orang memiliki imunitas natural yang sama sejak lahir, meskipun ada yang secara genetik berbeda. Imunitas adaptif berhubungan dengan respon imun spesifik yang secara selektif melawan benda asing tertentu yang pernah dikenali oleh tubuh sebelumnya. Kedua jenis imunitas bekerja dengan saling melengkapi untuk mengeliminasi agen asing berbahaya.^{1,8}

2.1.1. Imunitas Natural (Sistem Imun Nonspesifik)

Komponen dari imunitas natural adalah penjaga dan pengatur sistem pertahanan tubuh dari berbagai jenis serangan dari luar. Sel imun efektor, yaitu neutrofil dan makrofag yang bersifat fagositik sangat berperan dalam imunitas natural. Plasma membran protein (TLRs) juga berperan dalam mengenali benda asing yang masuk hingga akhirnya difagosit. TLRs akan teraktivasi saat zat patogen masuk dan menginduksi sel fagositik untuk menyelubungi dan merusak zat patogen penginfeksi tersebut. Imunitas natural memberikan gambaran yang jelas tentang respon yang cepat dan tidak selektif bagi tiap benda asing yang masuk ke dalam tubuh untuk mencegah infeksi meluas sampai akhirnya imunitas adaptif bekerja.^{1,8}

Secara umum, imunitas natural terdiri dari:^{1,8}

- pertahanan fisik yang mencegah masuknya kuman patogen dalam tubuh. Misalnya kulit, selaput lendir, silia saluran napas, batuk, dan bersin.

- pertahanan larut. Terdiri dari pertahanan biokimia yang disekresikan sebagai alat pertahanan tubuh, seperti lisozim dalam keringat, ludah, air mata, dan air susu, serta asam hidroklorida (HCl) pada cairan lambung. Bahan-bahan biokimia ini dapat melindungi tubuh terhadap kuman gram positif dengan menghancurkan dinding kuman tersebut. Lisozim yang dilepas makrofag dapat menghancurkan kuman gram negatif dengan menggunakan sistem komplemen. Sistem komplemen sendiri mengaktifkan sel-sel fagositik untuk membantu destruksi bakteri atau parasit, baik dengan menghancurkan membran selnya, maupun dengan mengikat permukaannya. Hal ini akan memudahkan mengarahkan makrofag untuk mengenali dan memakan bakteri atau parasit tersebut. Interferon juga menghasilkan glikoprotein yang mengandung nukleus dan dilepas sebagai respon terhadap infeksi virus. Interferon berperan menginduksi sel-sel sekitar yang terserang virus dan mengaktifkan sel NK.
- pertahanan selular melalui proses fagositosis yang dilakukan oleh sel mononuklear (monosit dan makrofag) dan sel polimorfonuklear (neutrofil). Selain itu sel NK yang disebut *Large Granular Lymphocyte* (LGL) berperan dalam merespon IL-12 yang dihasilkan oleh makrofag dan melepas IFN- γ yang mengaktifkan makrofag untuk membunuh zat patogen yang sudah dimakannya. Sel Mast berperan dalam reaksi alergi dan dalam pertahanan tubuh pejamu yang menderita imunodefisiensi.

2.1.2. Imunitas Adaptif (Sistem Imun Spesifik)

Sistem imun spesifik merupakan imunitas yang diperoleh karena induksi dan pemaparan substansi asing (antigen). Dalam menghancurkan benda asing yang berbahaya bagi tubuh, sistem imun dapat bekerja sendiri dan, umumnya, juga dapat bekerja sama dengan antibodi, komplemen, fagosit, dan makrofag T. Sistem imun spesifik terdiri dari sistem imun spesifik humoral dan seluler^{1,8}

2.1.2.1. Sistem Imun Spesifik Humoral

Dalam sistem imun spesifik humoral, yang berperan adalah sel limfosit B atau sel B yang berasal dari sel multipoten sumsum tulang. Bila terdapat benda asing, sel B akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang

membentuk antibodi dalam serum. Fungsi utamanya adalah mempertahankan tubuh terhadap infeksi bakteri, virus, dan menetralkan toksin. Antibodi atau immunoglobulin terdiri dari:^{1,8}

- **IgG:** merupakan Ig terbanyak dan biasa terdapat di cairan saraf sentral dan urin. IgG dapat menembus plasenta dan dapat ditemukan pada janin yang berusia 6-9 bulan. IgG memiliki sifat seperti komplemen yang membantu makrofag dalam mengenali sel sasarannya.
- **IgA:** ditemukan sedikit dalam serum dan memiliki kadar lebih tinggi pada cairan sekresi saluran napas, saluran cerna, saluran kemih, air mata, keringat, ludah, dan kolostrum. IgA berfungsi untuk menetralkan toksin atau virus dan mencegah kontak antara toksin atau virus dengan alat sasarannya.
- **IgM:** merupakan Ig terbesar dan kebanyakan sel B mengandung IgM. IgM merupakan respon imun primer yang dibentuk terlebih dahulu. IgM tidak dapat menembus plasenta, namun janin dapat membentuknya pada usia 12 minggu jika mendapatkan rangsangan. IgM merupakan komponen utama penyusun antibodi alamiah seperti isoaglutinin, golongan darah AB, dan antibodi heterofil.
- **IgD:** terdapat dalam darah dengan kadar yang sangat rendah (1% dari total serum) dan mempunyai aktivasi antibodi terhadap antigen berbagai makanan dan komponen nukleus.
- **IgE:** ditemukan sangat sedikit dalam serum. IgE mudah diikat sel mast, basofil, eosinofil, makrofag, dan trombosit. Kadar IgE tinggi ditemukan pada infeksi cacing, skistosomiasis, penyakit hidatid, trikinosis, dan alergi. IgE diduga berperan sebagai imunitas parasit. Pada alergi dikenal sebagai antibodi reagin.

2.1.2.2. Sistem Imun Spesifik Seluler

Dalam sistem imun ini, yang berperan adalah sel limfosit T atau sel T. Fungsi utamanya antara lain membantu sel B memproduksi antibodi, mengenal dan menghancurkan sel yang terinfeksi virus, mengaktifkan makrofag dalam proses fagositosis, serta mengontrol ambang dan kualitas sistem imun. Sel T

dibentuk dalam sumsum tulang, kemudian diproliferasi dan didiferensiasikan dalam kelenjar timus. Terdiri atas beberapa sel T: ^{1,8}

- **sel T Naif (*virgin*)**: sel limfosit yang meninggalkan timus tanpa mengalami diferensiasi dan terdapat dalam limfoid perifer. Setelah terpajan antigen, sel ini akan berubah menjadi Th0 kemudian berkembang sebagai sel efektor Th1 dan Th2.
- **sel T CD4 (Th1 dan Th2)**: sel ini masuk ke sirkulasi dan menetap dalam organ limfoid seperti kelenjar getah bening untuk bertahun-tahun. Th1 berperan dalam reaksi hipersensitivitas lambat, sedangkan Th2 berperan dalam meningkatkan produksi antibodi.
- **sel T CD8 (CTL/Tc)**: sel ini ditemukan pada semua sel tubuh yang bernukleus. Fungsi utamanya adalah menyingkirkan sel yang terinfeksi virus dengan cara menghancurkannya. Sel ini juga menghancurkan sel ganas dan sel histoinkompatibel yang menimbulkan penolakan pada transplantasi.
- **sel Ts/Tr**: sel Ts dikenal juga sebagai Th3 yang berperan dalam menekan aktivitas efektor sel T yang lain dan sel B. Ts ini diduga dapat mencegah respon Th1 dengan mengeluarkan sitokin immunosupresif untuk menghambat APC (berperan dalam mengubah sel T naif CD4 menjadi Th1)

Kedua sistem imun spesifik ini memiliki beberapa sifat dasar, antara lain: ^{1,8}

- ***specificity***: respon imun bersifat spesifik terhadap antigen tertentu. Antibodi atau limfosit dapat mengenal, secara spesifik, bagian protein kompleks atau molekul besar lainnya yang disebut sebagai determinan atau epitop.
- ***diversity***: tubuh manusia mempunyai sistem imun yang berpotensi mengenal antigen di lingkungan hidupnya, terutama limfosit yang mempunyai spesifitas terhadap antigen di dalam tubuh seluruhnya yang disebut dengan *lymphocyte repertoire*. Hal inilah yang menyebabkan limfosit dapat mendeferensiasi menjadi 10^9 determinan.

- **memory:** respon imun terhadap antigen akan meningkat efektivitasnya apabila terpapar antigen yang sama untuk kedua kali dan seterusnya. Hal ini disebut memori imunologikal yang diperankan oleh sel memori.
- **self limitation:** respon imun yang normal akan menurun dan menghilang beberapa waktu setelah stimulasi dihentikan.
- **discrimination of self from nonself:** sel pertahanan tubuh dapat membedakan antigen asing dari komponen tubuh sendiri. Limfosit akan bereaksi terhadap stimulasi antigen asing tetapi tidak memberi respon pada molekul dan komponen sendiri (*immune tolerance*).

2.2. Imunostimulasi

Imunostimulasi adalah suatu cara untuk memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem imun. Bahan yang dapat menstimulasi respon imun disebut imunostimulan atau imunostimulator.⁹ Berbagai bahan, baik buatan maupun alami, dapat berfungsi sebagai imunostimulan. Di Indonesia, telah lama dikenal suatu tanaman fitofarmaka yang tergolong sebagai imunostimulan, yaitu *Phyllanthus niruri*.⁵

2.2.1. Pangan Darurat BPPT

Pangan darurat BPPT merupakan pangan yang dibuat dengan nutrisi yang tinggi, serta mengandung ekstrak polifenol dari buah delima yang dapat meningkatkan sistem imun (imunostimulan). Dengan nutrisi yang tinggi, pangan ini dapat menggantikan porsi makanan lainnya. Dengan ekstrak polifenol, diharapkan pangan darurat BPPT dapat menjadi imunostimulan yang dapat mencegah angka kejadian penyakit yang cenderung naik pada korban pasca bencana.⁷

Pangan darurat BPPT akan dikemas seperti biskuit padat yang mengandung 500 kalori dalam setiap bungkusnya. Dengan mengonsumsi empat bungkus, konsumsi pangan darurat BPPT dapat mencukupi kebutuhan pangan orang dewasa yang berkisar 2100 kalori per harinya.⁷

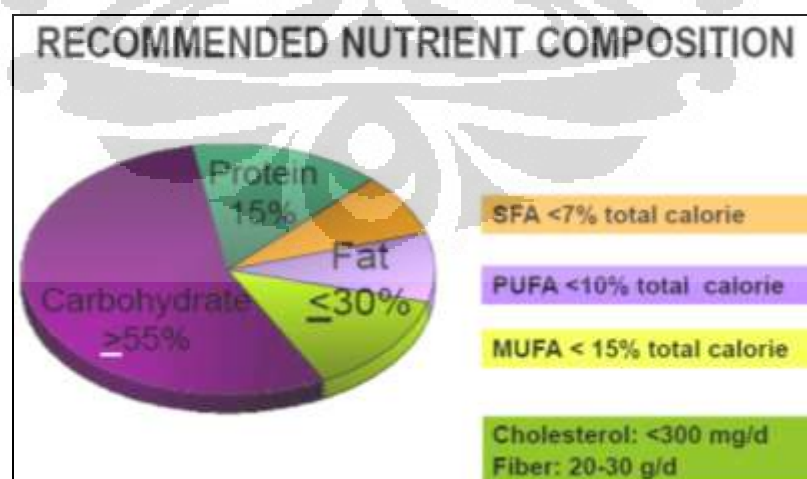
Pangan darurat BPPT memiliki isi sebagai berikut:

▪ Protein	7,1%
▪ Karbohidrat	66,6%
▪ Lemak	15,8%
▪ Abu	4,5%
▪ Serat	3,12%
▪ Polifenol	8,32 mg/gram
▪ Energi	437 kal/100gr

2.2.1.1. Nutrisi

Nutrisi sangat berpengaruh pada sistem imun, baik sistem imun nonspesifik maupun sistem imun spesifik. Adanya malnutrisi dapat mengakibatkan penurunan fungsi sistem imun (*immune-compromised*), seperti penurunan fungsi pertahanan fisik tubuh, fungsi sel imun, fungsi imunitas seluler, dan fungsi imunitas humoral. Penurunan fungsi sistem imun akan mengakibatkan peningkatan kerentanan terhadap penyakit.⁷

Nutrisi yang baik terdiri dari dua jenis nutrisi, yaitu nutrisi umum dan nutrisi spesifik (Gambar 2.1). Nutrisi umum meliputi kebutuhan energi atau kalori dan komposisinya (karbohidrat, protein, dan lemak), vitamin, dan mineral. Nutrisi khusus meliputi antioksidan (vitamin A, C, E, *carotenoids*, selenium, zinc, dan copper), glutamin, arginin, nukleotida, dan probiotik.⁷



▲ Gambar 2.1. Komposisi Nutrisi yang Direkomendasikan.⁷

2.2.1.2. Polifenol

Polifenol merupakan non-nutrien *phytochemicals* yang bersifat sebagai antioksidan dan banyak terdapat dalam tumbuhan dan buah-buahan.¹²⁻¹⁴ Polifenol bersifat Kelompok besar polifenol ditentukan berdasarkan struktur rangka karbonnya, menjadi *phenolic acids*, *flavonoids*, *stilbenes*, dan *lignans*. Polifenol bersifat sebagai reduktor yang dapat menjaga jaringan tubuh dari stres oksidatif. Struktur kimia polifenol akan mempengaruhi efek biokimianya, seperti bioavailabilitas, aktivitas antioksidan, serta interaksi spesifik dengan reseptor sel dan enzim.¹²

Sebagai antioksidan (reduktor), polifenol dapat menghambat pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Penurunan pembentukan ROS akan menghambat aktivitas fagositosis yang dilakukan oleh makrofag. Hal inilah yang menjadi alasan penggunaan polifenol (antioksidan) sebagai pencegah aterosklerosis. Selain sebagai antioksidan, polifenol juga dapat berperan sebagai pro-oksidan. Sifat antioksidan dan pro-oksidan suatu polifenol ditentukan oleh jenis cincin dalam struktur rangkanya dan konsentrasinya. Sebagai contoh pengaruh jenis rantai, polifenol dengan rantai *polyphenolic* lebih bersifat pro-oksidan daripada polifenol dengan rantai *catechol*. Sebagai contoh pengaruh dosis yang diberikan, polifenol dalam teh hijau dapat menjadi pro-oksidan jika diberikan dalam konsentrasi rendah (1-5 μM) dan dapat juga menjadi antioksidan jika diberikan dalam konsentrasi tinggi ($> 10 \mu\text{M}$).¹²

Polifenol dapat dimetabolisme oleh peroksidase untuk membentuk radikal *phenoxyl* yang pro-oksidan. Radikal ini bersifat cukup reaktif, bersama dengan ambilan oksigen dan pembentukan ROS, untuk mengoksidasi GSH dan NADH.¹²

Pada manusia sakit atau pada orang tua, dapat ditemukan produksi radikal bebas (ROS) yang berlebihan dan dapat merusak biomolekul besar (protein, DNA, dan lipid) secara oksidatif.¹⁴ Integritas membran lipid sel dan sel-sel sistem imun mengalami kerusakan akibat adanya stres oksidatif.¹³ Akan tetapi, ROS juga memiliki peran penting dalam sistem imun untuk menghadapi benda asing dan dalam sistem kaskade. Oleh karena itu, kadar ROS bukan harus diturunkan seminimal mungkin, melainkan dipertahankan dalam kadar yang seimbang.¹⁴

Konsumsi polifenol sebagai antioksidan dapat membantu mengurangi terbentuknya stres oksidatif tersebut sehingga dapat memperbaiki integritas membran lipid sel dan sistem imun.^{13,14}

Secara *in vitro*, polifenol (khususnya *flavonoids*) menghambat fungsi sistem imun, seperti proliferasi limfosit, aktivitas litik sel *Natural Killer* (NK), dan sekresi sitokin. Akan tetapi, pada penelitian Chen CM dkk.¹³ secara *in vivo*, penambahan diet tinggi polifenol dapat meningkatkan respon proliferasi limfosit, sekresi IL-2 dan IL-4 oleh limfosit yang teraktivasi, serta aktivitas litik sel NK pada manusia sehat secara signifikan.

Selain itu, pada penelitian Alvarez P dkk.¹⁴, ditemukan bahwa peran polifenol sebagai imunomodulator bukan saja melalui jalur keseimbangan stres oksidatif seperti di atas, melainkan juga dengan mekanisme fisiologi multifaktorial. Mekanisme fisiologi ini meliputi peningkatan sistem imun dan hormon, fasilitasi substansi dalam sistem pencernaan, metabolisme, imunomodulasi dan antioksidan, serta aktivitas antibakterial dan antiviral. Sereal tinggi polifenol, pada penelitian tersebut, dapat meningkatkan parameter leukosit, seperti kemampuan kemotaksis makrofag, aktivitas antimikroba (level anion superoksida interseluler), respon limfoproliferatif terhadap mitogen, IL-2, dan TNF- α . Perbedaan efek polifenol pada sistem imun yang berbeda secara *in vitro* dan *in vivo* mungkin disebabkan oleh perbedaan konsentrasi polifenol di dalam plasma dan fungsi spesifik metabolit polifenol.¹³

2.2.2. *Phyllanthus niruri*

Phyllanthus niruri adalah tumbuhan liar dengan tinggi 60 cm yang tumbuh di daerah tropis, seperti Indonesia, India, Brazil, hutan Amazon, dan Texas. Spesies *phyllanthus* yang dikenal sebagai bahan obat tradisional antara lain *P. amarus*, *P. urinaris*, *P. acidus*, *P. fraternus*, *P. Reticulatus*, dan *P. pinnatus*.^{6,10}

Phyllanthus merupakan salah satu dari lima fitofarmaka di Indonesia. Menurut Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (nomor HK.00.05.41.1384), “Fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji

praktik dan uji klinik, bahan baku dan produk jadi telah di standarisasi”^{6,10}

Di Indonesia, *Phyllanthus niruri* telah dipasarkan dalam bentuk sirup dan tablet dengan dosis 25 mg ekstrak *Phyllanthus niruri* setiap satu sendok takar (5 ml) sirup atau 50 mg ekstrak *Phyllanthus niruri* setiap satu kapsul. Produk ini telah memperoleh sertifikat fitofarmaka dari Badan POM RI tanggal 22 Maret 2005.^{5,13}

Akar dan daun *Phyllanthus niruri* mengandung beberapa senyawa flavonoid, seperti filantin, hipofilantin, quercetrin, isoquercetrin, astragalin, dan rutin. Dari minyak biji *Phyllanthus niruri*, telah diidentifikasi beberapa asam lemak yaitu, asam ricinoleat, asam linoleat, dan asam linolenat. Beberapa senyawa lignan baru juga telah diisolasi dari *Phyllanthus niruri* yaitu, *seco-4-hidroksilintetralin*, *seco-isoarisesinol trimetil eter*, *hidroksinirantin*, *dibenzilbutirolakton*, *nirfilin*, *neolignan (filnirurin)*. Dari sekian banyak zat yang terkandung dalam *Phyllanthus niruri*, belum diketahui mana yang memiliki efek antivirus. Hanya diketahui bahwa zat aktif *Phyllanthus niruri* bekerja terutama di hepar. Belum ditemukan kepustakaan yang membahas farmakokinetik *Phyllanthus niruri*.¹⁰

Phyllanthus niruri sebagai imunostimulan dapat memberikan efek terhadap sistem imun nonspesifik dan spesifik. Dalam suatu penelitian eksperimental pada mencit, dapat ditemukan adanya peningkatan fungsi sistem imun nonspesifik, seperti peningkatan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil, sitotoksitas sel NK, dan aktivitas hemolisis komplemen. Pada sistem imun spesifik, *Phyllanthus niruri* dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit T, meningkatkan sekresi TNF α dan IL-4, serta menurunkan aktivitas sekresi IL-2 dan IL-10. Pada suatu uji klinis ekstrak *Phyllanthus niruri* pada manusia, dapat ditemukan adanya peningkatan kadar IFN γ , kadar CD4, dan rasio CD4/CD8.¹⁵

2.3. Tetanus toksoid

Tetanus toksoid adalah toksin tetanus yang telah dinonaktifkan. Toksoid dibuat dengan cara membiakkan bakteri pada medium cair, memurnifikasikannya, dan menonaktifkan toksinnya.¹⁶

Tetanus toksoid, pertama kali, diproduksi pada tahun 1924 dan sukses digunakan untuk mencegah tetanus di kalangan tentara selama Perang Dunia II. Pada pertengahan tahun 1940-an, vaksin tetanus dikombinasikan dengan difteri toksoid dan vaksin pertusis yang inaktif menjadi vaksin DPT untuk imunisasi rutin pada anak-anak. Pada tahun 1991, produk DPT mendapat lisensi. Pada tahun 2005, dua tetanus toksoid dan difteri toksoid dengan aselular vaksin pertusis (Tdap) mendapat lisensi.¹⁶

Tetanus toksoid juga tersedia dalam bentuk tunggal, yaitu TT, namun bentuk ini jarang sekali diberikan. Tetanus toksoid dapat dikombinasikan dengan difteri toksoid (DT) untuk anak di bawah 7 tahun atau Td untuk anak di atas usia 7 tahun. Selain itu, TT juga dapat dikombinasikan dengan difteri dan pertusis sebagai DTaP (untuk anak di bawah 7 tahun) atau sebagai Tdap (untuk usia 10 tahun sampai 64 tahun). Semua bayi dan anak-anak harus mendapat tetanus toksoid yang merupakan bagian dari DTaP/Tdap. Orang dewasa sebaiknya diberikan dosis *booster* Td setiap 10 tahun. *Single dose* Tdap direkomendasikan untuk usia 11 tahun.¹⁶

Tetanus toksoid dibentuk menjadi preparasi *adsorbed* dengan menggunakan bahan tambahan untuk presipitasi garam. Bahan yang dapat digunakan antara lain aluminium hidroksida, aluminium potassium sulfat, atau aluminium fosfat. Bahan tambahan ini dapat menginduksi respon imun yang adekuat dengan dosis yang lebih sedikit dibandingkan dengan tetanus toksoid dalam preparasi cair. Selain itu, tetanus toksoid preparasi *adsorbed* juga dapat menginduksi antitoksin untuk jangka waktu yang lebih lama.¹⁷

Seperti vaksin yang diinaktivasikan atau jenis toksoid lainnya, tetanus toksoid dapat membentuk respon imun yang adekuat tidak dengan satu dosis saja. Di Amerika Utara, preparasi vaksin yang tersedia yaitu tetanus toksoid preparasi *adsorbed* dengan dosis 0,5 mL yang diberikan secara intramuskular dan preparasi cair yang diberikan secara subkutan. Kandungan tetanus toksoid dari produk komersial dinyatakan dalam satuan *limit of flocculation (Lf)*.¹⁷

Tetanus Toksoid (TT) berperan sebagai antigen yang dapat menginduksi

respon imun spesifik sel T pada manusia setelah vaksinasi. Respon imun dalam melawan tetanus toksoid dapat dilihat dengan menggunakan teknik *Elispot assay*. Teknik *Elispot assay* dapat menentukan jumlah *TT-specific-interferon-gamma* (IFN- γ) yang dihasilkan oleh sel T (respon imun spesifik). Selain menentukan kadar IFN- γ , teknik ini juga dapat memonitor jumlah sel T spesifik TT yang ada pada tubuh pendapat vaksinasi selama dua tahun terakhir. Jumlah *TT-specific-interferon-gamma* (IFN- γ) ini akan mencapai kadar puncak dalam 4 minggu setelah vaksinasi. Sekresi *TT-specific-interferon-gamma* (IFN- γ) dimediasi secara eksklusif oleh sel T CD4. Selain itu, produksi IFN- γ juga dapat dilakukan oleh HLA kelas II.¹⁸

Observasi respon imun terhadap tetanus toksoid juga dilakukan oleh Eibi dkk. pada tahun 1984. Untuk mempelajari efek vaksinasi pada sel limfosit T *helper* atau rasio supresor, penelitian ini menggunakan 11 orang sehat yang diberikan tetanus toksoid. Pada akhir penelitian, terdapat penurunan yang bermakna pada rasio T4/T8. Pada empat pasien, rasio T4/T8 turun sampai ≤ 1 . Kadar antibodi akan mulai meningkat sekitar 4 hari setelah vaksinasi sehingga pemberian vaksin saat terinfeksi tidak berguna.¹⁸

Standar emas untuk menilai respon imun terhadap tetanus toksoid adalah *toxin neutralization test* yang mengukur antitoksin aktif secara biologis di dalam serum. Tes ini dapat mendeteksi antitoksin sampai 0,001 IU/mL. Apabila dilakukan *in vivo*, tes ini memerlukan waktu dan biaya yang besar. Oleh karena itu, dikembangkanlah tes serologis secara *in vitro*, seperti *Passive Hemagglutination (PHA)*, *ELISA*, *radioimmunoassay*, *immunofluorescent assays*, *latex agglutination*, dan metode lainnya yang menggunakan agar presipitasi. Meskipun teknik *in vitro* sangat bermanfaat, teknik ini tidak dapat membedakan antibodi aktif secara biologis dengan *non-neutralizing antibodi*. PHA dan ELISA merupakan metode yang paling sering digunakan saat ini untuk menilai antitoksin terhadap tetanus.¹⁷

2.4. Metodologi

2.4.1. Metode

Untuk mengetahui efektivitas suatu zat, perlu dilakukan eksperimen terhadap zat tersebut. Pada penelitian eksperimental, penulis melakukan random alokasi dan sedapat mungkin melakukan '*blinding*', serta memberikan perlakuan atau intervensi pada subjek sesuai random alokasi tersebut. Kemudian, penulis melakukan pengukuran dan menganalisis efek perlakuan. Penelitian eksperimental ini dilakukan untuk membandingkan efek penggunaan pangan darurat BPPT dengan penggunaan ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai imunostimulan pada hewan coba.

Substansi tes diberikan secara oral dengan menggunakan alat bantu sonde lambung dengan jarum intubasi yang berukuran 3 *inch* dengan ujung bulat (*ball-tipped*). Substansi tes diberikan dengan dosis yang telah ditentukan pada beberapa grup dari hewan percobaan, satu dosis per grup. Substansi tes dilarutkan atau dipadatkan dalam pelarut air. Apabila tidak memungkinkan, pelarut air dapat diganti dengan minyak (contohnya minyak jagung) atau pelarut lainnya.¹⁹⁻²¹ Pada hewan rodensia, volume cairan tidak boleh melebihi 1ml/100g berat tubuh, kecuali pada kasus yang menggunakan air sebagai pelarut, yaitu dapat memberikan 2ml/100g.¹⁹⁻²⁰

Prosedur Mempersiapkan Persiapan Suspensi Materi:²⁵

1. Keluarkan vehikulum (CMC) dari pendingin 1 jam sebelum pencampuran.
2. Menggunakan kertas timbang untuk mengambil sejumlah materi dan timbang hingga mencapai jumlah yang diinginkan. Kemudian pindahkan ke dalam gelas beker.
3. Tambahkan 2 ml vehikulum (CMC) ke dalam gelas beker dan mulailah mengaduk hingga terbentuk adonan. Terus tambahkan vehikulum hingga mencapai $\frac{3}{4}$ volume total dan bersihkan spatula (alat pengaduk).

Periode pertama observasi adalah 4 minggu pertama. Pada akhir minggu ke-4, 6 hewan coba dari masing-masing grup akan dikorbankan untuk diperiksa secara hematologi. Kemudian, setiap hewan coba akan diberikan pajanan tetanus toksoid. Periode kedua observasi adalah 8 minggu pertama. Pada akhir minggu ke-

8, setiap hewan coba juga akan dikorbankan untuk diperiksa secara hematologi dan ELISA.

2.4.2. Hewan Percobaan (BALB-C)



▲ Gambar 2.2. Mencit Strain BALB-C.²²

Mencit BALB-C merupakan mencit albino berukuran kecil. Mencit ini dihasilkan pertama kali oleh McDowell tahun 1923 (Gambar 2.2). Mencit ini banyak digunakan dalam berbagai bidang penelitian, seperti kardiovaskular, produksi antibodi monoklonal, toksikologi, farmakologi, penuaan, teratologi, dan penelitian umum lainnya. Mencit untuk penelitian diproduksi melalui pemasangan kakak beradik sehingga memiliki sifat gen yang homogen. Setiap melahirkan, mencit dapat menghasilkan sekitar 5-7 anak dan berhenti menyusui anaknya saat berusia 19 hari.^{22,23}

Besar sampel hewan coba mencit diperoleh dengan menggunakan rumus Federer, sebagai berikut:

$$(t-1)(n-1) > 15$$

Keterangan: t = jumlah perlakuan; n = jumlah mencit untuk setiap kelompok perlakuan.

Jenis kelamin sampel penelitian, sebaiknya, menggunakan jenis kelamin jantan dan betina untuk setiap kelompok perlakuan. Namun, mengingat keterbatasan biaya dan norma etik penelitian eksperimental hewan coba, penulis hanya menggunakan satu jenis kelamin, yaitu betina.

Suhu ruangan tempat merawat hewan percobaan harus sekitar 18-26°C dan kelembaban relatif sebesar 40-70%.²⁴⁻²⁷ Jika menggunakan cahaya buatan, cahaya harus diset menjadi 12 jam terang dan 12 jam gelap. Untuk pemberian makan, dapat digunakan pangan darurat BPPT pada kelompok uji dan pangan BR2 pada kelompok pembanding dengan penyediaan air minum tidak terbatas. Dalam satu kandang mencit, seharusnya, ditempati oleh dua ekor mencit agar setiap mencit mendapat porsi tempat yang nyaman dan porsi pangan yang sama.^{19,20} Akan tetapi, karena keterbatasan biaya, pada penelitian ini, satu kandang dapat ditempati oleh 6 ekor mencit.

2.4.3. Saat Percobaan

Mencit harus berpuasa selama 12 jam sebelum pemberian pangan. Pangan diberikan sesuai dengan ketentuan masing-masing kelompok percobaan dengan dosis yang disesuaikan dari dosis manusia. Intervensi dilakukan selama delapan minggu dengan observasi pada minggu ke-4, pemberian pajanan tetanus toksoid pada minggu ke-4, dan observasi pada minggu ke-8. Pada setiap observasi, 6 ekor mencit dalam setiap kelompok akan dikorbankan untuk diperiksa hematologi dan ELISA. Hasil penelitian akan digunakan untuk membandingkan efek intervensi terhadap respon sistem imun tubuh.

2.4.4. Pengukuran Dosis

Untuk menghitung volume dosis zat yang akan diberikan sebagai cairan (*liquids*) kepada hewan (*individual*), dapat menggunakan rumus:

$$\text{Volume dosis untuk hewan (ml)} = \text{volume dosis (ml/kgBB)} \times \text{berat badan hewan (kg)}$$

2.4.4.1. Dosis Pangan Darurat BPPT

Pada manusia, jumlah pangan darurat BPPT sebagai pangan tambahan yang dianjurkan setiap harinya sebesar 400 gr. Bila dikonversikan pada hewan coba, dosis yang dianjurkan:

$$K \times 400\text{gr/hari} = 1,04 \text{ gram/ hari} \approx 1 \text{ gram/hari}$$

Keterangan: K= koefisien mencit 0,0026

2.4.4.2. Dosis *Phyllanthus niruri*

Pada manusia, jumlah dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* sebagai imunostimulan setiap harinya sebesar 4 gram. Bila dikonversikan pada hewan coba, dosis yang dianjurkan:

$$K \times 4 \text{ gr/hari} = 0,01 \text{ gram/hari} \approx 10 \text{ mg/hari}$$

Keterangan: K= koefisien mencit 0,0026

2.4.4.3. Dosis Tetanus Toksoid

Dosis tetanus toksoid yang digunakan disesuaikan dengan dosis yang diberikan pada anak yaitu 0,5ml/10kg BB. Pada hewan coba dengan daya tahan tubuh yang lebih tinggi dosis tersebut dikalikan dengan koefisien (20) sehingga didapatkan dosis 1 ml/kgBB. Karena setiap mencit memiliki berat badan $\pm$ 18-20 gram, dosis yang didapat oleh seekor mencit sebesar 0,01 ml.

2.4.5. Pemeriksaan Hematologi dan ELISA

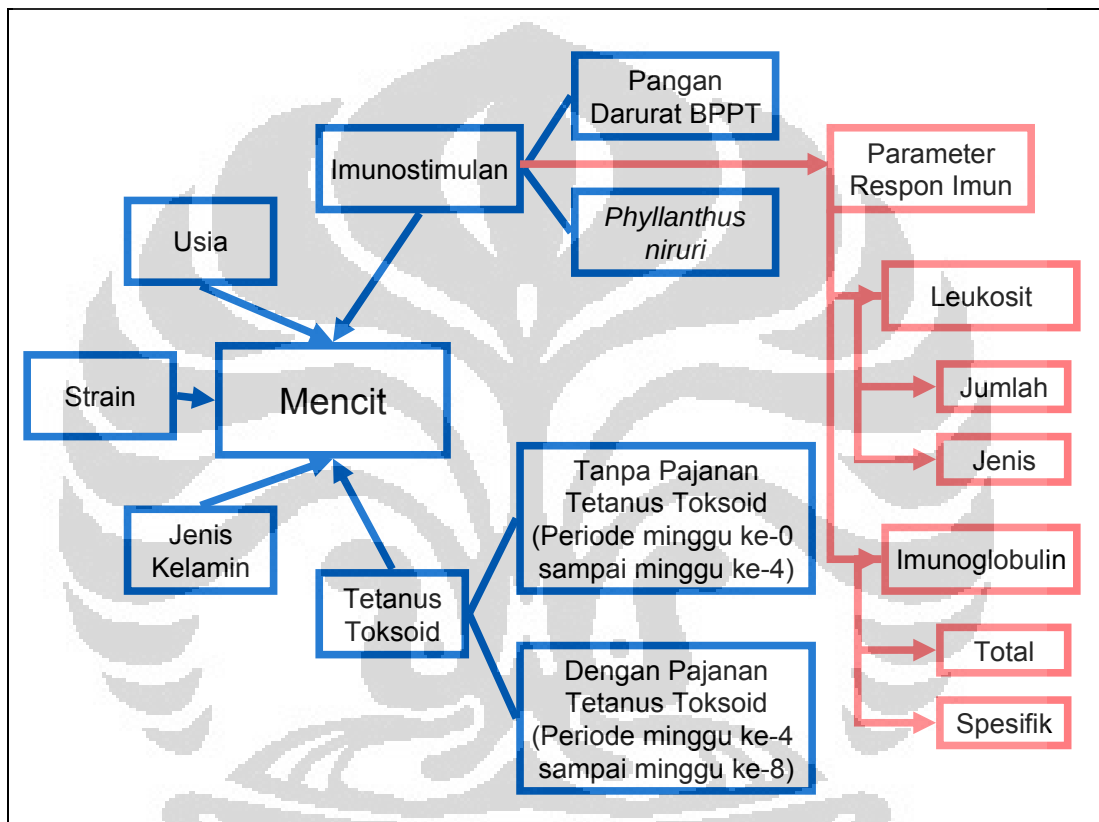
Untuk melihat efek intervensi pada penelitian ini, akan diperiksa jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan spesifik. Pengambilan darah mencit dilakukan dengan cara dekapitasi.²⁷ Cara ini dipilih untuk mencapai jumlah darah yang dibutuhkan. Sebelum dekapitasi, mencit akan dianestesi dengan menggunakan eter.²⁸

Darah mencit yang terkumpul akan dibagi menjadi dua bagian, yaitu untuk penghitungan jumlah dan jenis leukosit, serta penghitungan kadar IgG total dan spesifik. Dalam menghitung jumlah leukosit total, digunakan metode manual dan otomatis yang dikirim ke Laboratorium Ragunan.^{29,30} Dalam menghitung jenis leukosit, digunakan pembuatan dan pewarnaan sediaan hapus darah tepi dengan pewarnaan Wright.²⁹⁻³² Dalam menghitung kadar IgG total dan spesifik, digunakan metode ELISA.³³

Jumlah leukosit total dan hitung jenis leukosit sangat bervariasi, tergantung pada genetik, faktor lingkungan, dan metode pemeliharaan. Sebagian besar jenis leukosit yang ditemukan pada darah manusia juga dapat ditemukan pada mencit. Proporsi jenis limfosit terhadap jumlah leukosit total lebih tinggi pada mencit

dibandingkan pada manusia. Pada darah mencit dewasa, tidak pernah ditemukan basofil.²⁴

KERANGKA KONSEP



▲ Gambar 2.3. Kerangka Konsep.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental pada hewan coba mencit (*mouse*), yaitu dengan *true experimental design*. Pada desain penelitian ini, dilakukan observasi jangka waktu sepuluh minggu yang dibagi menjadi ke dalam empat periode, yaitu periode minggu awal (dua minggu sebelum periode minggu ke-0), periode minggu ke-0, periode minggu ke-4, dan periode minggu ke-8. Pada akhir minggu ke-0, minggu ke-4, dan minggu ke-8, enam ekor mencit akan dikorbankan untuk mengambil sampel darah. Pada akhir minggu ke-4, setiap kelompok akan diberikan pajanan tetanus toksoid. Sampel darah akan digunakan untuk menghitung jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan spesifik.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Februari tahun 2009 hingga bulan Agustus tahun 2011. Berikut adalah rangkaian kegiatan penelitian:

- Pemeliharaan mencit dan pengambilan sampel dilaksanakan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Pewarnaan slide hematologi dan pemeriksaan kadar imunoglobulin di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman.
- Penghitungan jenis leukosit dilaksanakan di Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan di Ruang Praktikum Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Penghitungan jumlah dan pemeriksaan darah lengkap dilaksanakan di Laboratorium Ragunan.
- Pengolahan data dilaksanakan di Laboratorium Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Penulisan laporan.

3.3. Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Sampel penelitian adalah mencit strain BALB-C betina. Sampel ini memiliki usia dan berat badan yang relatif sama, yaitu ± 20 minggu (usia dewasa) dan $\pm 18-20$ gram. Pengambilan sampel dilakukan secara random alokasi untuk setiap perlakuan. Besar sampel hewan coba mencit diperoleh dengan menggunakan rumus Federer, yaitu sebagai berikut:

$$(t-1)(n-1) > 15$$

$$(4-1)(n-1) > 15$$

$$3(n-1) > 15$$

$$n-1 > 5$$

$$n > 6$$

Keterangan :

Penelitian ini merupakan penelitian bersama yang terdiri dari 4 perlakuan sehingga besar sampel dihitung secara keseluruhan. Peneliti hanya mengambil data dari dua perlakuan, yaitu perlakuan uji pangan darurat BPPT dan perlakuan pembanding dengan ekstrak *Phyllanthus niruri*.

t = jumlah perlakuan = 4 perlakuan (perlakuan uji pangan darurat BPPT, perlakuan kontrol dengan pangan biasa BR2, perlakuan pembanding dengan ekstrak *Phyllanthus niruri*, dan perlakuan tambahan pangan darurat BPPT yang tidak mengandung zat aktif).

n = jumlah mencit untuk setiap kelompok perlakuan.

3.4. Identifikasi Variabel

- Variabel bebas: pangan darurat BPPT.
- Variabel terikat: jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan IgG spesifik.
- Variabel perancu: seks.

3.5. Cara Pengambilan Data

Mencit betina strain BALB-C yang berusia ± 20 minggu dan memiliki berat badan $\pm 18-20$ gram dibuat menderita lapar pada dua minggu pertama dengan diberi pangan biasa BR2 (**LAMPIRAN 1**). Kemudian, mencit dibagi ke

dalam dua perlakuan. Perlakuan pertama yaitu kelompok mencit yang diberikan pangan biasa BR2 dan pangan darurat BPPT dengan kadar polifenol 8,32 mg/gram per oral dengan menggunakan sonde satu kali sehari selama 8 minggu. Perlakuan kedua yaitu kelompok mencit yang diberi pangan biasa BR2 dan ekstrak *Phyllanthus niruri* per oral dengan menggunakan sonde satu kali sehari selama 8 minggu. Pada akhir minggu ke-0, minggu ke-4, dan minggu ke-8, enam ekor mencit akan dikorbankan untuk mengambil sampel darah. Pada akhir minggu ke-4, setiap kelompok mencit juga akan diberikan pajanan tetanus toksoid. Hasil sampel darah akan digunakan untuk membandingkan efek kedua perlakuan terhadap sistem imun nonspesifik dan spesifik.

3.5.1. Pelaksanaan Teknis

Subyek penelitian terdiri dari enam ekor mencit yang dibagi secara random menjadi empat kelompok, yaitu:

- KLPU (Kelompok Lapar diberi Pangan Uji) dengan pangan darurat BPPT
 - minggu ke-4 (KLPU-4)
 - minggu ke-8 (KLPU-8)
- KLPP (Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding) dengan ekstrak *Phyllanthus niruri*
 - minggu ke-4 (KLPP-4)
 - minggu ke-8 (KLPP-8).

Subyek penelitian akan diberikan pajanan tetanus toksoid pada akhir minggu ke-4 untuk dilihat hasilnya pada akhir minggu ke-8. Pelaksanaan teknis penelitian dapat diurai sebagai berikut:

1. Pada dua minggu pertama, kedua kelompok mencit diaklimatisasi dengan diberi pangan biasa BR2 dengan dosis 3,5 gram/ekor dalam satu hari yang dibagi rata ke dalam dua kali pemberian, yaitu pada pukul 09.00 dan pukul 15.00. Aklimatisasi ini bertujuan untuk membuat mencit lapar.
2. Pada akhir dua minggu pertama atau yang dihitung sebagai awal periode minggu ke-0 penelitian, 6 ekor mencit yang diberi pangan biasa BR2 diambil sampel darahnya dengan dekapitasi. Sampel darah digunakan untuk pemeriksaan hematologi dan ELISA awal.

3. Selama empat minggu kemudian, yaitu periode minggu ke-0 sampai periode minggu ke-8 penelitian, kelompok perlakuan uji pangan darurat BPPT (KLPU) diberikan 1 gram pangan darurat BPPT per oral dengan menggunakan sonde pada pukul 09.00 dan diberikan 1,75 gram pangan biasa BR2 per oral secara alami pada pukul 11.00 dan pukul 15.00 WIB. Kelompok perlakuan pembanding (KLPP) diberikan 10 mg ekstrak *Phyllanthus niruri* per oral dengan menggunakan sonde pada pukul 09.00 dan diberikan 1,75 gram pangan biasa BR2 per oral secara alami pada pukul 11.00 dan pukul 15.00 WIB.
4. Pada akhir minggu ke-4, 6 ekor mencit dari masing-masing kelompok perlakuan dikorbankan untuk diambil sampel darahnya untuk pemeriksaan hematologi dan ELISA.
5. Sisa mencit dari masing-masing kelompok perlakuan diberikan paparan tetanus toksoid (TT) dengan dosis 0,01 mL untuk dilihat hasilnya pada periode minggu ke-8.
6. Pada akhir minggu ke-8, 6 ekor mencit dari masing-masing kelompok perlakuan dikorbankan untuk diambil sampel darahnya untuk pemeriksaan hematologi.
7. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan cara dekapitasi memakai gunting. Sebelumnya, mencit dianestesi dengan menggunakan eter. Sampel darah akan dipakai sebagai sampel penghitungan jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan IgG spesifik antitetanus toksoid untuk membandingkan efek penggunaan pangan darurat BPPT dengan penggunaan ekstrak *Phyllanthus niruri* terhadap sistem imun.

3.5.2. Cara Menghitung Jumlah Leukosit Total

Menggunakan metode manual

Alat:

- pipet 20 μ l
- pipet volumetrik 0,5 ml, 2 ml, dan 4 ml
- tabung ukuran 75 x 12 mm
- kamar hitung *improved Neubauer* yang dilengkapi dengan kaca penutup

yang khusus

- pipet Pasteur
- mikroskop cahaya.

Reagen: larutan Turk yaitu larutan asam asetat 2% ditambah gentian violet 1% sebanyak 1 ml.

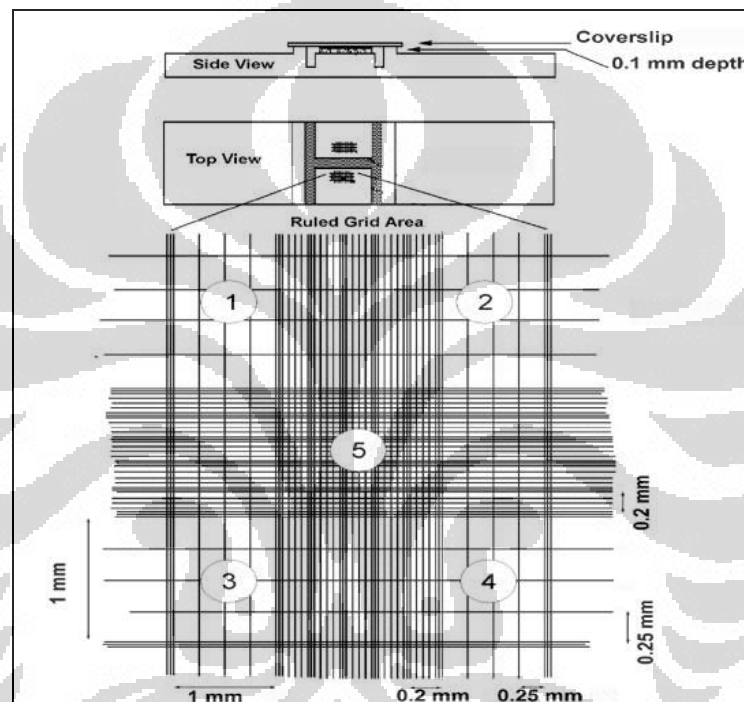
Bahan pemeriksaan: darah EDTA dengan kadar 2 mg Na₂EDTA/K₂EDTA untuk 2 ml darah.

Cara kerja :

- a. Membuat pengenceran 1 : 20, dengan langkah sebagai berikut:
 - i. Larutan pengencer sebanyak 0.38 ml dimasukkan dengan menggunakan pipet volumetrik 0,5 ml ke dalam tabung ukuran 75 x 10 mm.
 - ii. Tambahkan 20 µl darah EDTA ke dalam tabung tersebut sehingga darah diencerkan 1 : 20. Pada waktu mengambil 20 µl darah EDTA, jangan lupa mengocok botol darah dengan baik agar darah di dalam botol menjadi homogen. Sebelum memasukan 20 µl darah ke dalam larutan pengencer, hapuslah kelebihan darah yang ada di luar pipet.
 - iii. Darah yang tersisa di dalam pipet dibilas dengan mengisap dan mengeluarkan larutan pengencer sebanyak 3 kali.
 - iv. Tabung tersebut ditutup dengan parafilm dan dicampur hingga homogen selama 1 menit.
- b. Mengisi kamar hitung
 - i. Kaca penutup-kamar hitung diletakkan pada tempatnya. Kamar hitung harus dalam keadaan bersih dan kering.
 - ii. Isilah kamar hitung dengan darah yang sudah diencerkan tadi dengan menggunakan pipet Pasteur.
 - iii. Untuk hitung leukosit kamar hitung setelah diisi dibiarkan selama 3 menit.
- c. Menghitung jumlah sel
 - i. Letakkan kamar hitung dengan hati-hati di bawah mikroskop dalam keadaan rata air. Perhitungan sel dilakukan dengan menggunakan lensa

obyektif 10 kali dan lensa okuler 10 kali (10×10).

- ii. Perlu dihitung minimal 100 sel. Hal ini dapat dicapai dengan menghitung semua leukosit yang ada pada ke 4 bidang besar yang masing-masing luasnya 1 mm^2 yaitu bidang 1, 2, 3, 4 (**Gambar III-1**) dengan volume dihitung sebesar $4 \times 1 \times 0,1 \mu\text{l} = 0,4 \mu\text{l}$. Atau bila jumlah leukosit dalam 2 buah bidang besar telah melebihi jumlah 100 sel maka dapat dilakukan perhitungan jumlah leukosit dengan catatan bahwa volume yang dihitung sebesar $2 \times 1 \times 0,1 = 0,2 \mu\text{l}$.



▲ Gambar 3.1. Kamar Hitung *Improved Neubaur*.^{26,27}

d. Perhitungan

- i. Jumlah leukosit yang dihitung = jumlah leukosit/volume yang dihitung (μl) x faktor pengenceran
- ii. Bila jumlah leukosit dalam ke 4 bidang besar adalah N, maka :
- iii. Jumlah leukosit = $N/0,4 \times 20/\mu\text{l} = 50N/\mu\text{l}$ darah tau $0.05 N \times 10^9/\text{L}$

3.5.3. Cara Menghitung *Differential Leucocyte*

Membuat dan mewarnai sediaan hapus darah tepi.

Bahan: darah segar yang berasal dari vena yang dihapuskan pada kaca objek.

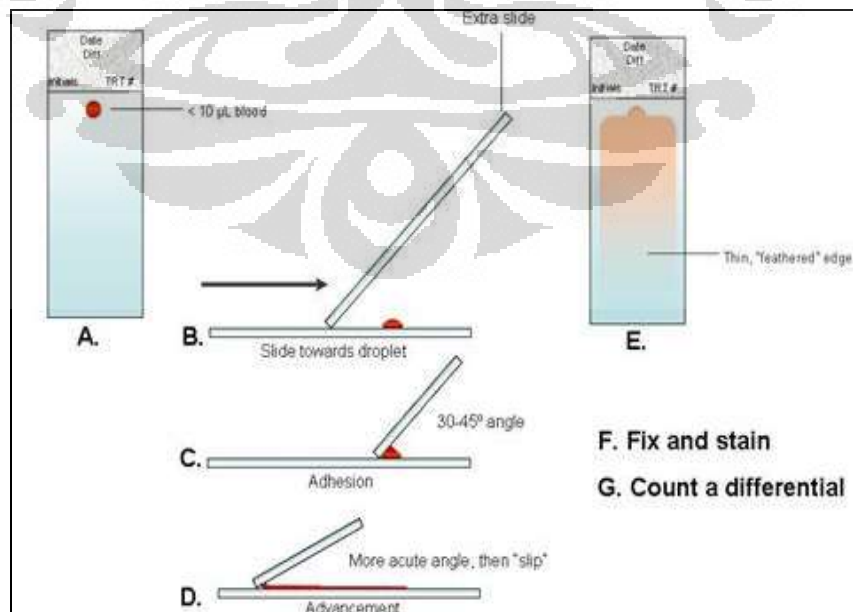
Alat:

- objek ukuran 25 x 75 mm
- Batang gelas
- Rak kaca objek
- Pipet Pasteur

Reagen: zat warna Wright 1 gram dan metanol absolut 600 ml.

Cara membuat sediaan hapus:

- a. Pilihlah kaca objek yang bertepi rata sebagai “kaca penghapus”.
- b. Letakkan satu tetes kecil darah, pada $\pm 2-3$ mm dari ujung kaca objek. Letakkan kaca penghapus dengan sudut $30-45^\circ$ terhadap kaca objek di depan tetes darah.
- c. Tarik kaca penghapus ke belakang sehingga menyentuh tetes darah, tunggu sampai darah menyebar pada sudut tersebut.
- d. Dengan gerak yang mantap, doronglah kaca penghapus sehingga terbentuk hapusan darah sepanjang 3-4 cm pada kaca objek (**Gambar III-2**). Darah harus habis sebelum kaca penghapus mencapai ujung lain kaca objek.
- e. Biarkan hapusan darah mengering di udara dan segera difiksasi dengan *methanol absolute* selama 2-3 menit. Tuliskan identitas mencit pada bagian tebal hapusan dengan pensil.



▲ Gambar 3.2. Cara pembuatan sediaan hapus darah tepi.^{26,27}

Cara mewarnai sediaan hapus menggunakan pewarnaan Wright:

- a. Letakkan sediaan hapus yang telah difiksasi pada dua batang gelas di atas bak tempat pewarnaan.
- b. Genangi sediaan hapus dengan zat warna Wright. Biarkan selama 3-5 menit.
- c. Tambahkan larutan darah dalam jumlah yang sama dengan zat warna. Tiup agar larutan darah tercampur rata dengan zat warna. Biarkan selama 5-10 menit.
- d. Bilas dengan air ledeng, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat. Kemudian biarkan sediaan mengering.

Cara memeriksa: letakkan satu tetes minyak imersi pada bagian sediaan hapus yang baik untuk diperiksa dan tutup dengan kaca tutup. Lihat dengan pembesaran lemah (10 x 10) untuk mendapatkan gambaran menyeluruh. Selanjutnya lihat dengan lensa objektif 40x.

3.5.4. Cara Menghitung Jumlah IgG Total dan IgG Spesifik

Metode yang digunakan adalah metode ELISA.

Gambaran Umum: Peralatan atau kit ELISA IgG mencit dirancang untuk menghitung IgG pada serum atau plasma mencit. Tes ini menggunakan anti IgG mencit (*goat antimouse IgG antibodies*) untuk imobilisasi fase solid (bagian yang solid atau *microtiter wells*) dan *horseradish* peroksidase (HRP) yang dikonjugasikan dengan anti antibodi IgG mencit (*goat antimouse IgG antibodies*) untuk deteksi. Menentukan spesivitas IgG dilakukan dengan deteksi antibodi yang diabsorpsi silang pada kolom agarosa IgM dan IgA mencit, Reaktivitas silang dengan immunoglobulin dari spesies lain tidak diinvestigasi.

Prinsip Tes: Sampel dilarutkan dan diinkubasikan pada *microtiter wells* selama 45 menit di dekat IgG standar mencit yang disiapkan. Kemudian *microtiter wells* dicuci dan konjugasi HRP ditambahkan dan diinkubasikan selama 45 menit. Molekul IgG seperti *sandwich* yang terletak di antara imobilisasi dan deteksi antibodi. *Microtiter wells* kemudian dicuci untuk menghilangkan HRP-berlabel antibodi yang tidak terikat dan reagen TMB ditambahkan dan diinkubasikan

selama 20 menit pada temperatur ruangan. Hal ini akan mengakibatkan munculnya warna biru. Warna tidak akan bertambah biru jika ditambahkan Stop Solution, mengubah warna biru menjadi kuning dan densitas optik diukur dengan spektrofotometri pada 450 nm. Konsentrasi IgG proporsional dengan densitas optik dari sampel dan diperoleh dari kurva standar.

Alat dan bahan yang tersedia dengan kit:

- anti IgG mencit yang menutupi 96 well plate (12 strips pada 8 well)
- reagen konjugasi HRP 11 ml
- standar referensi (*lyophilized*)
- 20x larutan pencuci (*wash solution*) 50 ml
- 10x *diluent* (50 ml)
- reagen TMB (satu langkah) 11 ml
- *stop solution* (1 N HCl) 11 ml.

Alat dan bahan yang dibutuhkan tapi tidak tersedia pada kit:

- pipet yang akurat dan tip
- air yang telah didistilasi dan air deionisasi
- *polypropylene* atau gelas tabung
- *vortex mixer*
- kertas serap
- *micro-plate incubator/shaker mixing* dengan kecepatan kurang lebih 150 rpm
- *plate washer*
- *plate reader* dengan rentang densitas optik 0-4 pada 450 nm
- *graph paper* (PC *graphing software*)

Penyimpanan Kit Tes: peralatan tes akan bertahan selama 6 bulan. *Microtiter plate* sebaiknya disimpan dalam tas tertutup.

Instruksi Umum:

- a. Baca dan pahami instruksi secara menyeluruh sebelum menggunakan kit.
- b. Semua reagen harus mencapai suhu ruangan (18-25 °C) sebelum digunakan.

- c. Hasil yang optimum akan tercapai jika, pada setiap langkah, reagen dimasukkan ke *wells* dengan pipet dalam 5 menit.

Persiapan untuk *Diluent*: *diluent* tersedia dalam 10 stok. Sebelum menggunakan, perkirakan volum akhir dari diluen yang dibutuhkan untuk tes dan larutkan satu volume dari 10 stok dengan 9 volume air yang terdistilasi dan deionisasi.

Persiapan *Wash Solution* (Larutan Pencuci): *wash solution* atau larutan pencuci tersedia dalam 20 stok. Sebelum menggunakannya, larutkan isi dari botol (50 ml) dengan 950 ml air yang terdistilasi atau deionisasi.

Persiapan Standar:

- a. Standar IgG mencit tersedia dalam bentuk stok *lyophilized*. Mengembalikan ke dalam bentuk original (rekonstitusi) dengan 1,0 ml air terdistilasi atau deionisasi (rekonstitusi standar stabil pada suhu 40 °C selama seminggu tetapi sebaiknya disimpan dalam lemari pendingin pada suhu -200 °C setelah rekonstitusi jika akan digunakan kembali)
- b. Beri label 8 *polypropylene* atau gelas tabung dengan 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; dan 0 ng/ml.
- c. Ambil dengan menggunakan pipet volume diluen yang detailnya terdapat pada IgG standar dengan label pada tabung yang diberi label 500 ng/ml. Lalu tambahkan volume IgG standar yang diindikasikan dan campurkan. Ini merupakan standar 500ng/ml.
- d. Tambahkan 250 µl diluen ke dalam tabung yang telah diberi label 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; dan 0 ng/ml.
- e. Siapkan standar untuk 250 ng/ml dengan melarutkan dan mencampurkan 250 µl dari standar 500 µl dengan 250µl diluen di dalam tabung berlabel 250 ng/ml.
- f. Dengan cara yang sama siapkan standar untuk 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 ng/ml

Persiapan Sampel: IgG ada di dalam plasma atau serum mencit dengan konsentrasi kurang lebih 15 mg/ml. Untuk mendapatkan nilai yang ada dalam rentang pada kurva standar, disarankan sampel awalnya dilarutkan 200.000 kali

dengan menggunakan prosedur di bawah ini untuk setiap sampel yang dites:

- a. Tambahkan 998 μ l dan 798 μ l dari 1 x diluen ke dalam tabung yang terpisah.
- b. Ambil dengan pipet dan campur 2 μ l serum/ plasma ke dalam tabung yang berisi 998 μ l diluen. Ini merupakan 500 kali sampel yang dilarutkan.
- c. Campurkan 2 μ l dari 500 kali sampel yang dilarutkan dengan 798 μ l diluen pada tabung kedua. Ini merupakan 200.000 kali pelarutan dari sampel.
- d. Ulang prosuder ini untuk setiap sampel yang dites.
- e. Ekstrak jaringan dan cairan tubuh dibandingkan dengan serum atau plasma mungkin memiliki kadar IgG yang lebih rendah.

Prosedur Tes:

- a. Amankan jumlah *wells* yang diinginkan pada rak atau tempat lain yang memungkinkan.
- b. Tambahkan 100 μ l standard sampel yang telah dilarutkan ke dalam *wells*.
- c. Inkubasi pada *orbital micro-plate shaker* pada 100-150 rpm pada suhu ruangan (18-250 °C) selama 45 menit.
- d. Aspirasi isi dari microtiter dan cuci *wells* 5 kali dengan 1 kali larutan pencuci (*wash solution*) dengan menggunakan *plate washer* (400 μ l/*well*). Prosedur mencuci sebaiknya dilakukan dengan cepat.
- e. Benturkan dengan tajam *wells* ke kertas penyerap untuk menghilangkan semua residu *buffer* pancuci.
- f. Tambahkan 100 μ l reagen konjugasi enzim pada setiap *well*.
- g. Inkubasi pada *orbital micro-plate shaker* pada 100-150 rpm pada suhu ruangan.
- h. Cuci dengan prosedur nomor 4 dan 5.
- i. Tambahkan 100 μ l reagen TMB pada setiap *well*.
- j. Campur pada *orbital micro-plate shaker* pada 100-150 rpm pada suhu ruangan.
- k. Hentikan reaksi dengan menambahkan 100 μ l *stop solution* pada setiap *well*.
- l. Campurkan (langkah ini penting untuk memastikan warna biru menjadi kuning).

- m. Baca densitas optik pada 450 nm dengan pembaca *microtiter plate* dalam 5 menit.

Kalkulasi Hasil:

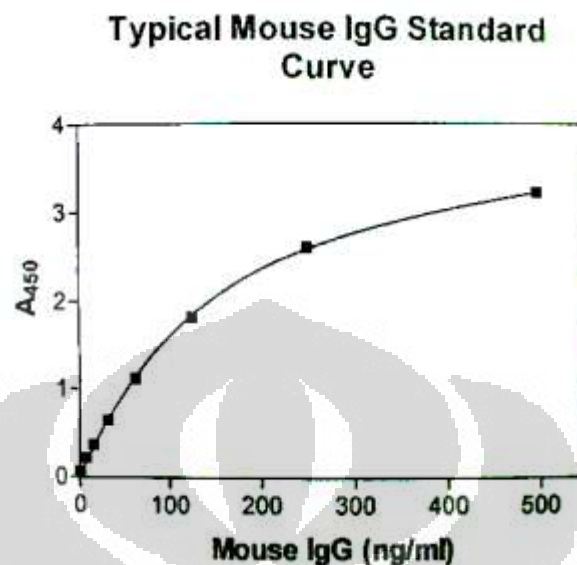
- Kalkulasi rata-rata nilai absorpsi ($\text{\AA}$ 450) untuk setiap set pada standar referensi dan sampel.
- Buat kurva standar dengan memplot rata-rata nilai absorpsi yang diperoleh dari masing-masing standar referensi dengan konsentrasi standar referensi dalam ng/ml pada kertas grafis linear, dengan nilai absorpsi pada sumbu vertikal dan konsentrasi pada sumbu horizontal.
- Gunakan rata-rata nilai absorpsi untuk setiap sampel, tentukan konsentrasi IgG dalam ng/ml dari kurva standar.
- Kalikan konsentrasi yang diperoleh dengan faktor dilusi untuk menentukan konsentrasi aktual pada sampel IgG.
- Langkah 4 membutuhkan *PC graphing software*.
- Jika nilai OD450 di luar rentang pada kurva standar, sampel sebaiknya dilarutkan dengan tepat dan dites ulang.

Kurva Standar: kurva standar dengan densitas optik pada 450 nm pada sumbu Y dan konsentrasi IgG pada sumbu X ditunjukkan pada grafik di bawah. Kurva ini bertujuan hanya sebagai ilustrasi dan sebaiknya tidak digunakan untuk mengkalkulasi. Masing-masing pengguna harus memperoleh data masing-masing kurva standar untuk setiap eksperimen.

▼ Tabel 3.1. Hubungan Konsentrasi IgG dengan Densitas Optik pada 450 nm.³⁰

IgG (ng/ml)	Absorpsi (450 nm)
500	3,215
250	1,298
125	1,820
62,5	1.126
31,25	0,652
15,63	0,372
7,81	0,221

0 0,067



▲ Gambar 3.3. Kurva Standar Hubungan Konsentrasi IgG dengan Densitas Optik pada 450 nm.³⁰

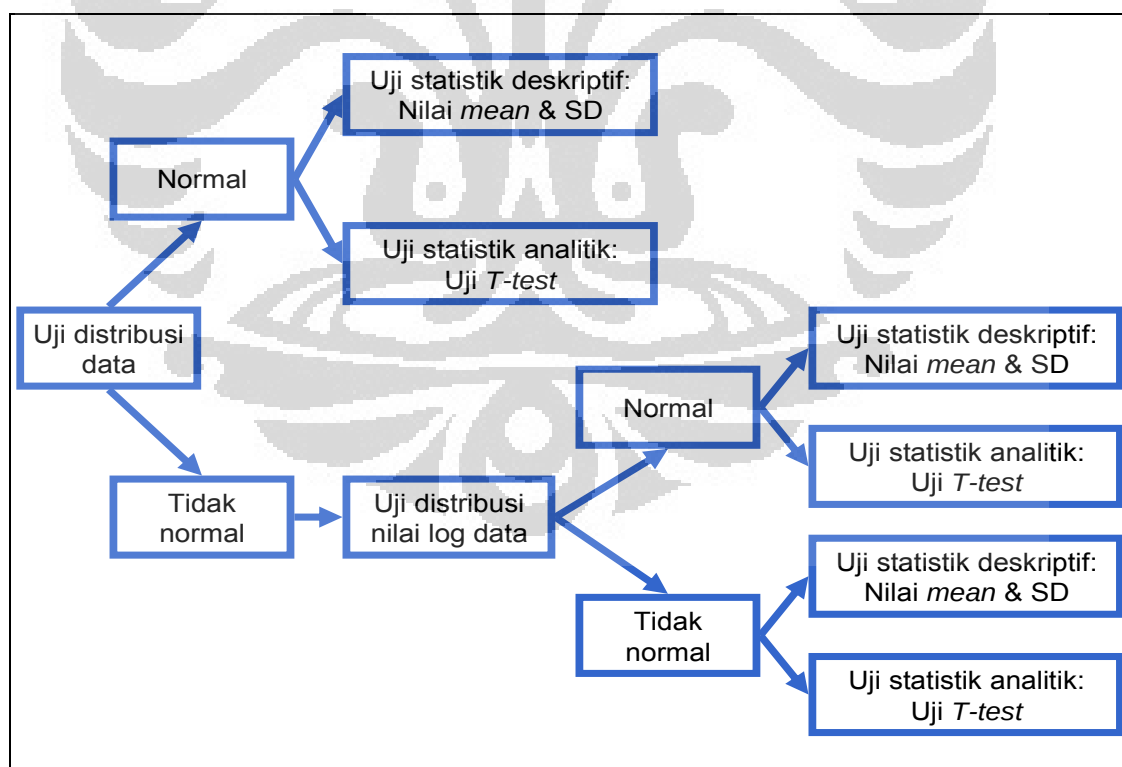
Pada penelitian ini, akan didapatkan nilai *absorbance* pada pengerjaan ELISA untuk IgG total dan IgG spesifik. Untuk IgG total, nilai *absorbance* hasil spektrofotometri dikonversi menjadi nilai kadar IgG dengan bantuan kurva standar IgG dan rumus matematika yang didapatkan dari program SPSS. Hasil kadar IgG total didapatkan dalam satuan ng/mL. Untuk IgG spesifik anti-TT, penelitian ini menggunakan kit ELISA yang mendapatkan hasil *absorbance* semikuantitatif sehingga nilai yang ada tidak dapat dikonversi menjadi nilai kadar IgG spesifik anti-TT dan tidak memiliki satuan.

3.6. Rencana Manajemen dan Analisis Data

Pada akhir penelitian akan diperoleh data mengenai respon imunitas tubuh yang berupa jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan IgG spesifik pada masing-masing kelompok perlakuan. Data yang diperoleh akan dimasukkan ke dalam *dummy* tabel (LAMPIRAN 2) dan diolah menggunakan SPSS *for windows* versi 11.5.

Data yang diuji dalam penelitian ini berupa selisih data pada periode minggu yang lebih akhir dengan data pada periode minggu yang lebih awal.

Kemudian, data diuji distribusinya dengan uji normalitas Shapiro-Wilk karena jumlah subyek penelitian kurang dari 50 subyek penelitian. Data yang terdistribusi normal akan diuji statistik deskriptif dengan melihat nilai *mean* dan standar deviasi (SD), serta diuji statistik analitik dengan uji T tidak berpasangan atau *unpaired T-test* (uji hipotesis komparatif dua kelompok tidak berpasangan dengan data variabel numerik yang berdistribusi normal). Data yang tidak terdistribusi normal akan diuji kembali distribusinya dengan menggunakan nilai log data. Apabila dengan nilai log data, data tersebut menjadi terdistribusi normal, maka nilai log data akan diuji statistik deskriptif dengan melihat nilai *mean* dan standar deviasi (SD), serta diuji statistik analitik dengan uji T tidak berpasangan atau *unpaired T-test*. Apabila dengan nilai log data, data tersebut tetap tidak terdistribusi normal, maka data akan diuji statistik deskriptif dengan melihat nilai median, maksimum, dan minimum, serta diuji statistik analitik dengan uji *nonparametric Mann-Whitney* (uji hipotesis komparatif dua kelompok tidak berpasangan dengan data variabel numerik yang tidak berdistribusi normal).



▲ Gambar 3.4. Rencana Manajemen dan Analisis Data.

Untuk melihat perubahan data masing-masing kelompok pada setiap akhir minggu penelitian (minggu ke-0, ke-4, dan ke-8), juga dilakukan uji *one-way*

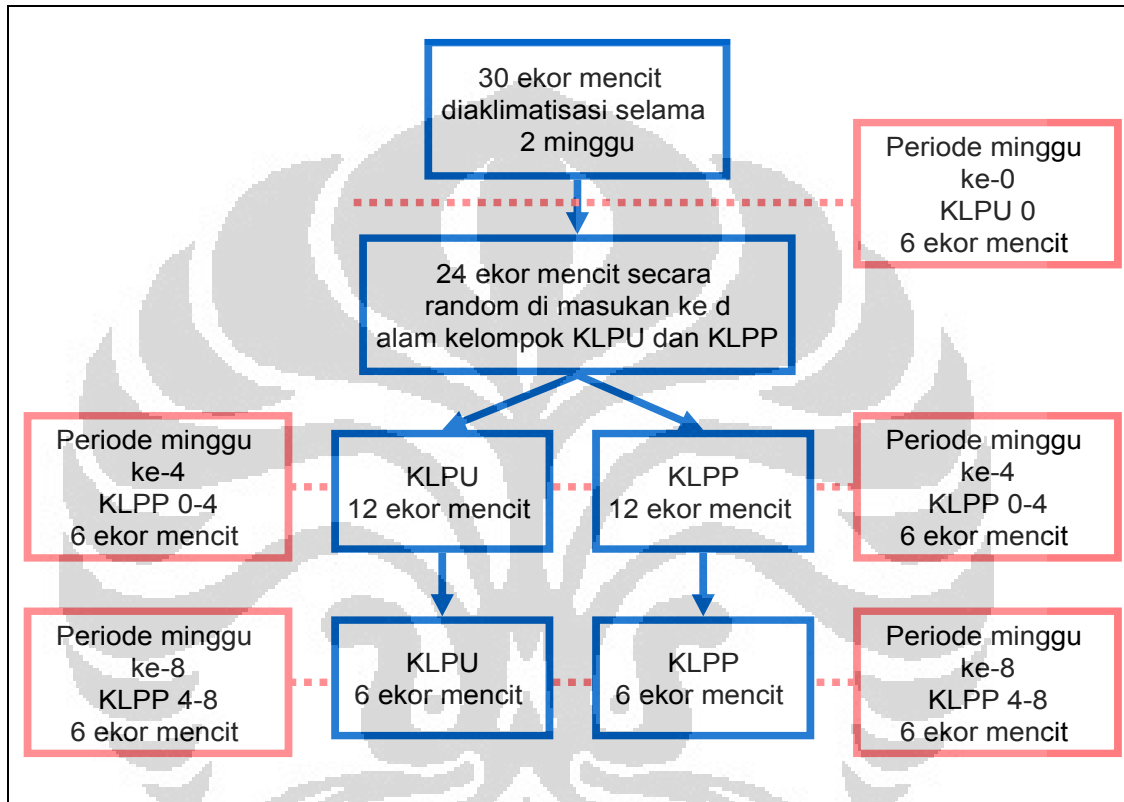
anova (uji hipotesis komparatif lebih dari dua kelompok dengan data variabel numerik yang berdistribusi normal). Uji ini dilakukan pada data yang berdistribusi normal. Uji ini akan diikuti dengan analisis *post hoc* LSD. Untuk data yang tidak berdistribusi normal, uji yang dapat digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis* (uji hipotesis komparatif lebih dari dua kelompok dengan data variabel numerik yang tidak berdistribusi normal). Uji ini akan diikuti dengan analisis *post hoc* *Mann-Whitney*.

3.7. Definisi Operasional

1. **Pangan darurat BPPT** merupakan pangan bernutrisi tinggi dan mengandung ekstrak polifenol dari buah delima yang diharapkan dapat meningkatkan sistem imun.
2. **Imunostimulan pembanding** yang digunakan adalah ekstrak *Phyllanthus niruri*.
3. **Kondisi lapar** merupakan kondisi yang diciptakan (aklimatisasi) dengan membatasi pemberian pangan sekitar setengah dari porsi pangan yang seharusnya. Dalam penelitian ini, kondisi lapar dicapai melalui proses aklimatisasi selama dua minggu sebelum penelitian dimulai. Pangan yang diberikan adalah pangan biasa BR2 sejumlah 3,5 gram/ekor/hari yang dibagi rata ke dalam dua kali pemberian, yaitu pada pukul 09.00 dan pukul 15.00.
4. **Tetanus toksoid (TT)** diberikan kepada setiap kelompok perlakuan sebagai pajanan atau *challenge*. TT diberikan dengan dosis 0,01 ml dalam satu kali interval pemberian secara parenteral intramuskular.
5. **Respon imun** adalah respon pertahanan tubuh untuk mencegah dan mengeliminasi benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Dalam penelitian ini, respon imun yang diperiksa adalah jumlah dan jenis leukosit, serta respon imun spesifik humoral, yaitu kadar IgG total dan spesifik.
6. **Jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan spesifik** dihitung dengan cara manual seperti yang telah dijelaskan pada poin cara kerja di atas.
7. **Keadaan umum** merupakan data tambahan yang didapatkan dalam

pemeriksaan klinis dalam penelitian. Dalam penelitian ini, terdapat tiga keadaan umum, yaitu jumlah sel darah merah, kadar hemoglobin, dan kenaikan berat badan.

3.8. Alur Penelitian



▲ Gambar 3.5. Alur Penelitian.

3.9. Masalah Etik Penelitian

Dalam penelitian ini, penulis menggunakan jumlah hewan coba yang sesuai dengan perhitungan sebenarnya.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Parameter Respon Imun

Dalam penelitian ini, parameter respon imun yang digunakan adalah jumlah dan jenis leukosit, serta kadar IgG total dan IgG spesifik anti-TT. Berdasarkan uji normalitas yang dilakukan sebelumnya (**LAMPIRAN 3**), dapat dilihat bahwa ada beberapa data yang tidak terdistribusi normal, yaitu data jumlah leukosit, eosinofil, limfosit, dan monosit. Data tersebut seharusnya ditransformasi ke dalam nilai log, tetapi karena nilai data tersebut mengandung nilai minus (-), data tidak dapat ditransformasi sehingga uji yang akan dipakai adalah uji *nonparametric Mann-Whitney*. Data yang terdistribusi normal akan diuji dengan uji T tidak berpasangan atau *unpaired T-test*. Akan tetapi, sebelumnya, perlu diperhatikan hasil *Levene's test* (uji hipotesis varians data) untuk melihat hasil uji T mana yang akan dipakai. Apabila varians data sama (nilai p pada *Levene's test* > 0,05), hasil uji T yang dipakai adalah hasil uji yang melihat varians data (*equal varians assumed*) dan sebaliknya.

▼ Tabel 4.1. Nilai Mean, SD, dan p Data Jumlah Basofil, Batang, dan Segmen.

Kelompok	Basofil ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			Batang ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			Segmen ($\times 10^3/\mu\text{L}$)		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
KLPU 0-4	0.00	0.00	0.363	-1.17	26.77	0.051	239.33	525.64	0.876
KLPP 0-4	6.00	14.69		57.17	55.07		191.50	513.44	
KLPU 4-8	0.00	0.00	0.363	9.67	10.09	0.032	-15.17	444.87	0.759
KLPP 4-8	-6.00	14.67		-42.83	43.97		99.00	761.66	

Keterangan:

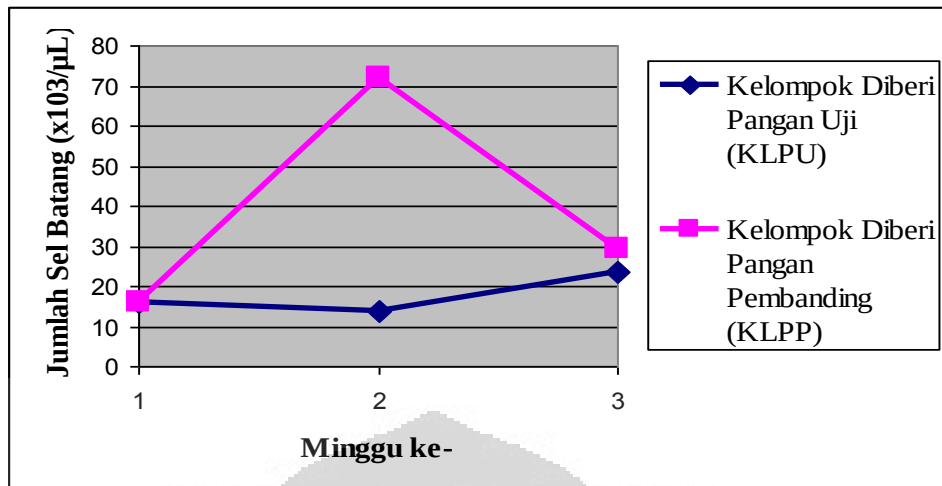
KLPU 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPP 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPU 4-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-8 dan minggu ke-4; KLPP-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding

periode minggu ke-8 dan minggu ke-4.

Dari tabel di atas (Tabel 4.1), dapat dilihat hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai p data jumlah basofil, batang, dan segmen Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4 (KLPU 0-4) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4 (KLPP 0-4) yang bernilai $> 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut pada periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4.

Dari tabel di atas (Tabel 4.1), juga dapat dilihat hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai p data jumlah basofil dan segmen Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPU 4-8) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPP 4-8) yang bernilai $> 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8.

Dapat dilihat juga hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai p data jumlah batang Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPU 4-8) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPP 4-8) yang bernilai $< 0,05$, yaitu $p = 0.032$ (Tabel 4.1). Perbedaan yang bermakna ini dapat disebabkan oleh perbedaan efek pangan uji dengan pangan pembanding. Pada minggu ke-4 sampai minggu ke-8, pangan uji cenderung meningkatkan jumlah batang, sedangkan pangan pembanding cenderung menurunkannya (Gambar 4.1).



▲ Gambar 4.1. Jumlah Sel Batang Berdasarkan Minggu Percobaan.

Dengan uji *one-way annova* yang diikuti LSD, tidak ditemukan perbedaan bermakna jumlah basofil, baik pada Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) maupun pada Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8. Dengan uji yang sama (Gambar 4.1), dapat ditemukan adanya peningkatan bermakna jumlah batang Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-4, serta penurunan bermakna jumlah batang Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-4 dan minggu ke-8 ($p = 0.004$ dan $p = 0.027$). Dengan uji *Kruskal-Wallis* yang diikuti uji *Mann-Whitney*, tidak ditemukan perbedaan bermakna jumlah segmen, baik pada Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) maupun pada Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8.

▼ Tabel 4.2. Nilai Median, Minimum, Maksimum, dan p Data Jumlah Leukosit, Eosinofil, Limfosit, dan Monosit.

Kelompok	Leukosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				Eosinofil ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			
	Median	Minimum	Maksimum	p	Median	Minimum	Maksimum	p
KLPU 0-4	0.6	-0.1	7.6	0.945	-5	-61	46	0.086
KLPP 0-4	1.1	0.5	3.9		34	-10	108	
KLPU 4-8	-0.8	-5.7	0	0.320	5	-46	29	0.087
KLPP 4-8	-0.7	-1.6	4.8		-45	-108	0	

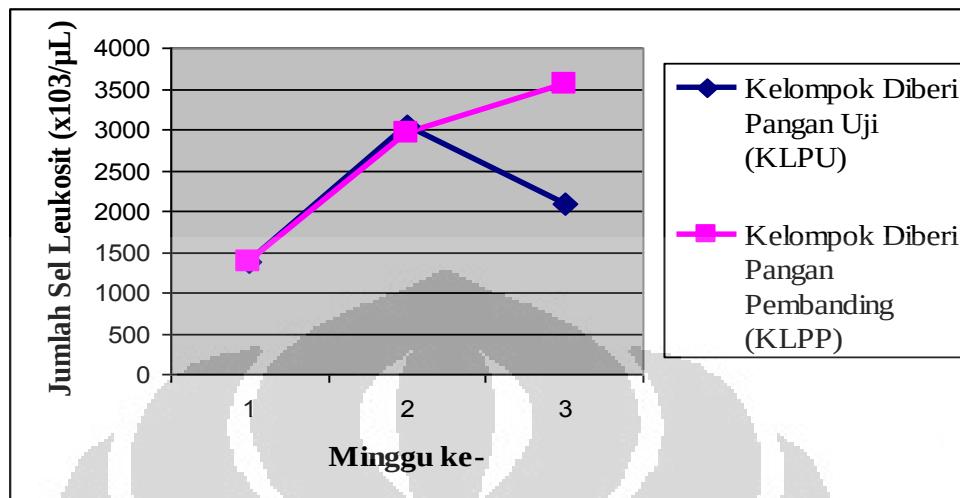
Kelompok	Limfosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				Monosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			
	Median	Minimum	Maksimum	p	Median	Minimum	Maksimum	p
KLPU 0-4	394.5	-651	5864	0.200	32	2	592	0.109
KLPP 0-4	822.5	495	2752		-25.5	-136	239	
KLPU 4-8	-562	-4595	2156	0.200	-119	-370	20	0.109
KLPP 4-8	223.5	-1248	3561		54	-216	450	

Keterangan:

KLPU 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPP 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPU 4-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-8 dan minggu ke-4; KLPP-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-8 dan minggu ke-4.

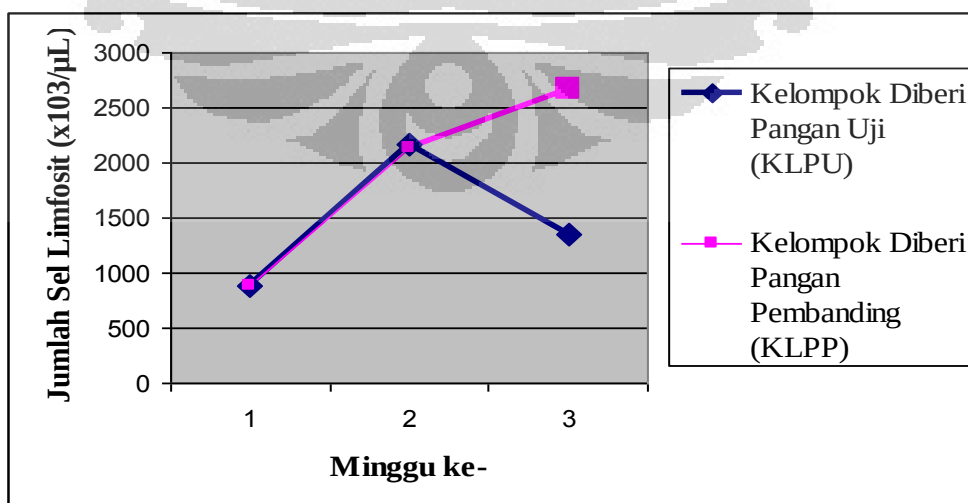
Dari tabel di atas (Tabel 4.2), dapat dilihat hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai p data jumlah basofil, eosinofil, limfosit, dan monosit, baik Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4 (KLPU 0-4) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4 (KLPP 0-4) maupun Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPU 4-8) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPP 4-8), yang bernilai $> 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang

bermakna antara kedua kelompok tersebut pada periode minggu ke-0, ke-4, dan ke-8.



▲ Gambar 4.2. Jumlah Sel Leukosit Berdasarkan Minggu Percobaan.

Dengan uji *one-way annova* yang diikuti LSD (Gambar 4.2), dapat ditemukan adanya peningkatan bermakna jumlah leukosit Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8 ($p = 0.036$). Dengan uji *Kruskal-Wallis* yang diikuti uji *Mann-Whitney*, tidak ditemukan perbedaan bermakna jumlah eosinofil, baik pada Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) maupun pada Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8.



▲ Gambar 4.3. Jumlah Sel Limfosit Berdasarkan Minggu Percobaan.

Dengan uji *one-way annova* yang diikuti LSD (Gambar 4.3), dapat ditemukan adanya peningkatan bermakna jumlah limfosit Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8 ($p = 0.022$). Dengan uji yang sama, tidak ditemukan perbedaan bermakna jumlah monosit, baik pada Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) maupun pada Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8.

Efek dari polifenol, salah satu kandungan penting dalam pangan darurat BPPT, adalah meningkatkan respon proliferasi limfosit oleh mitogen dan IL-2, sekresi IL-2 dan IL-4 oleh limfosit yang teraktivasi, kemampuan kemotaksis limfosit dan makrofag, serta aktivitas litik sel NK.^{13,14} Jika terjadi peningkatan kemotaksis limfosit dan makrofag oleh polifenol, akan terjadi penurunan jumlah limfosit dan monosit pada darah tepi. Pada Tabel 4.2 di atas, dapat dilihat adanya penurunan jumlah leukosit, limfosit, dan monosit Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8. Penurunan yang tidak bermakna secara statistik ini dapat diakibatkan oleh dosis pemberian yang lebih rendah daripada dosis pemberian pada penelitian Alvarez dkk..¹⁴ Pada penelitian Alvarez dkk., digunakan 10 gram sereal per minggu yang mengandung 152,4 gram polifeno. Pada penelitian ini, digunakan 7 gram pangan darurat BPPT yang mengandung 58,24 gram polifenol.

Efek yang ditimbulkan oleh ekstrak *Phyllanthus niruri* pada Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) berbeda dengan efek polifenol pada Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) berbeda dengan pada yang menggunakan ekstrak *Phyllanthus niruri*. *Phyllanthus niruri* sebagai imunostimulator dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan kemotaksis netrofil, kemotaksis makrofag, sitotoksitas sel NK, dan aktivitas hemolisis komplemen.¹⁵ Seiring dengan efek kemotaksis netrofil dan makrofag oleh *Phyllanthus niruri*, dapat dilihat adanya penurunan jumlah segmen pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (Tabel 4.1) dan penurunan jumlah monosit pada periode minggu ke-0 sampai pada minggu ke-4 (Tabel 4.2). Akan tetapi, efek kemotaksis makrofag pada kelompok ini tidak sesuai yang diharapkan. Pada Tabel 4.2, dapat dilihat adanya peningkatan monosit kembali pada periode minggu ke-4 sampai pada minggu ke-8.

▼ Tabel 4.3. Nilai *Mean*, SD, dan p Data Kadar IgG Total dan Kadar IgG Spesifik Anti-TT.

Kelompok	Kadar IgG Total (ng/mL)			Kadar IgG Spesifik Anti-TT		
	Mean	SD	p	Mean	SD	P
KLPU 0-4	35.219	145.57	0.699	0.007	0.20	0.179
KLPP 0-4	-4.658	167.68		0.147	0.07	
KLPU 4-8	-1.503	134.93	0.826	-0.024	0.20	0.008
KLPP 4-8	-16.822	68.21		0.452	0.23	

Keterangan:

KLPU 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPP 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPU 4-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-8 dan minggu ke-4; KLPP-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-8 dan minggu ke-4.

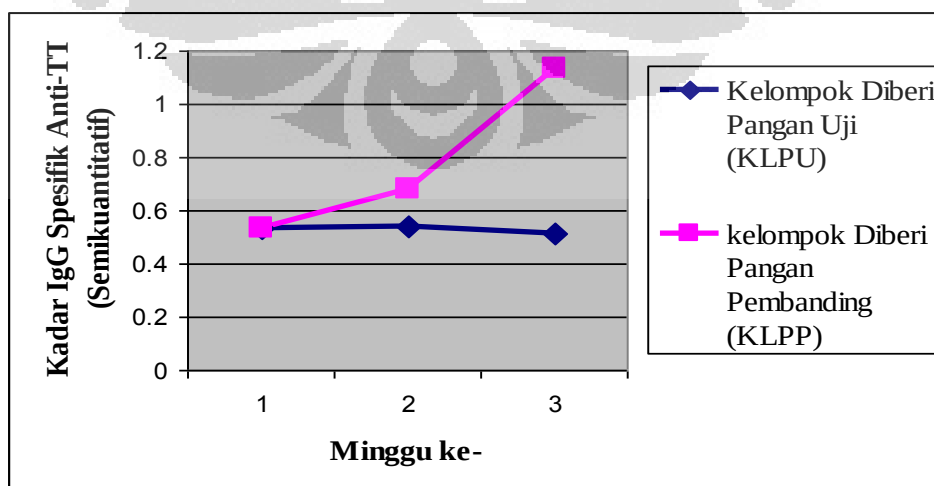
Dari tabel di atas (Tabel 4.3), dapat dilihat hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai p data kadar IgG total dan kadar IgG spesifik Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4 (KLPU 0-4) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4 (KLPP 0-4) yang bernilai $> 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut pada periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4.

Dari tabel di atas (Tabel 4.3), juga dapat dilihat hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai p data kadar IgG total Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPU 4-8) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPP 4-8) yang bernilai $> 0,05$. Hal ini juga menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8.

Dengan uji *one-way annova* yang diikuti LSD, dapat ditemukan adanya peningkatan yang tidak bermakna kadar IgG total Kelompok Diberi Pangan Uji

(KLPU) antara minggu ke-0 dan minggu ke-4 dan penurunan yang tidak bermakna antara minggu ke-4 dan minggu ke-8. Dengan uji yang sama, juga dapat ditemukan penurunan yang tidak bermakna kadar IgG total Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) sejak minggu ke-0 sampai pada minggu ke-8. Peningkatan kadar IgG total Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) antara minggu ke-0 dan minggu ke-4 sesuai dengan peningkatan kadar IgG dan IgM yang seharusnya terjadi pada pemberian imunostimulan. Akan tetapi, penurunan yang ada tidak sesuai.

Pada data kadar IgG spesifik anti-TT dalam tabel di atas (Tabel 4.3), dapat dilihat hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai p Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPU 4-8) dan Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 (KLPP 4-8) yang bernilai $< 0,05$, yaitu $p = 0.008$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kedua kelompok tersebut pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan efek pangan uji dengan pangan pembanding. Dengan melihat nilai mean kadar IgG spesifik anti-TT kelompok yang diberi pangan uji yang bernilai minus, yaitu -0.024, dapat disimpulkan adanya efek penurunan kadar IgG spesifik anti-TT pada kelompok yang diberi pangan uji. Hal ini sangat berbeda dengan adanya peningkatan kadar IgG spesifik anti-TT pada kelompok yang diberi pangan pembanding dengan nilai mean 0.452.



▲ Gambar 4.4. Kadar IgG Spesifik Anti-TT Berdasarkan Minggu Percobaan.

Dengan uji *one-way annova* yang diikuti LSD (Gambar 4.4), tidak ditemukan perbedaan bermakna kadar IgG spesifik anti-TT, baik pada Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) maupun pada Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8. Dengan uji yang sama, dapat ditemukan adanya peningkatan bermakna kadar IgG spesifik anti-TT Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8 ($p = 0.000$).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Melayer S dkk.,¹⁸ jumlah TT-*specific-interferon-g* (IFN-g) dan kadar IgG akan mencapai puncaknya dalam 4 minggu setelah vaksinasi tetanus toksoid dan kemudian turun. Berdasarkan penelitian ini, penurunan kadar IgG total dan spesifik anti-TT kelompok yang diberi pangan uji pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8 dapat dibenarkan. Penurunan kadar IgG total dan spesifik anti-TT ini menunjukkan kadar antibodi yang terukur telah melewati titik puncaknya dan sedang berada dalam tahap penurunan. Akan tetapi, hal ini tidak sesuai dengan peningkatan kadar IgG spesifik anti-TT kelompok yang diberi pangan pembanding pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8. Pada penelitian lain yang dilakukan Stabley A dkk.,¹⁷ dikatakan bahwa kadar antibodi terhadap tetanus toksoid mencapai kadar puncak dalam dua minggu setelah vaksinasi. Setelah mencapai puncak, kadar antibodi menurun secara cepat dalam waktu dua bulan dan menurun secara bertahap dalam beberapa tahun kemudian.

4.2. Data Tambahan

Dalam penelitian ini, data tambahan yang didapatkan adalah jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan kenaikan berat badan. Berdasarkan uji normalitas yang dilakukan sebelumnya (LAMPIRAN 3), dapat dilihat bahwa sebaran seluruh data terdistribusi normal.

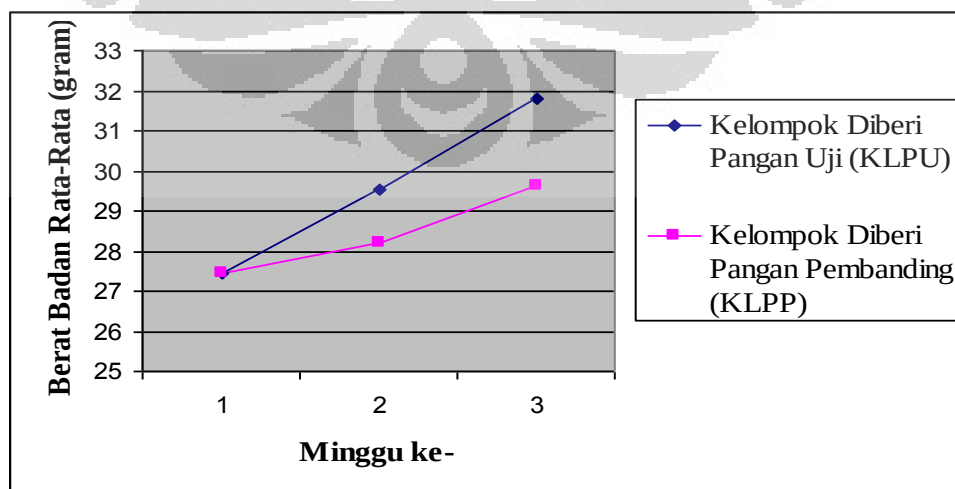
▼ Tabel 4.4. Nilai *Mean*, *SD*, dan *p* Data Jumlah Eritrosit, Kadar Hemoglobin, dan Kenaikan Berat Badan.

Kelompok	Sel Darah Merah			Hemoglobin			Kenaikan berat Badan		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
KLPU 0-4	-0.432	1.650	0.338	-1.260	1.993	0.281	2.032	2.088	0.193
KLPP 0-4	0.582	2.008		0.140	2.745		0.756	1.558	
KLPU 4-8	-0.698	1.694	0.991	-1.460	2.830	0.923	1.794	1.662	0.494
KLPP 4-8	-0.512	0.845		-1.000	1.000		0.665	2.138	

Keterangan:

KLPU 0-4 = Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4; KLPP 0-4 = Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4; KLPU 4-8 = Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8; KLPP-8 = Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8.

Dari tabel di atas (Tabel 4.4), dapat dilihat hasil perbandingan (*significancy*) atau nilai *p* data jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan kenaikan berat badan setiap kelompok yang bernilai $> 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok tersebut, baik pada periode minggu ke-0 sampai minggu ke-4 maupun pada periode minggu ke-4 sampai minggu ke-8.



▲ Gambar 4.5. Berat Badan Rata-Rata Berdasarkan Minggu Percobaan.

Dengan uji *one-way annova* yang diikuti LSD, tidak ditemukan perbedaan bermakna jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin, baik pada Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) maupun pada Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8. Dengan uji yang sama (Gambar 4.4), dapat ditemukan adanya peningkatan bermakna berat badan rata-rata mencit Kelompok Diberi Pangan Uji (KLPU) antara minggu ke-0 dan minggu ke-4, antara minggu ke-4 dan ke-8, serta antara minggu ke-0 dan ke-8 ($p = 0.033$, $p = 0.024$, dan $p < 0.0001$). Kenaikan berat badan rata-rata mencit kelompok pangan uji yang sangat signifikan dapat disebabkan oleh padatnya nutrisi dan kalori yang ada pada pangan darurat BPPT. Pangan darurat BPPT merupakan pangan yang dibuat dengan nutrisi dan kalori yang tinggi, yaitu sekitar 500 kalori per bungkus. Dengan nutrisi tinggi, pangan ini dapat menggantikan porsi makanan lainnya.⁷

Dengan uji yang sama (Gambar 4.4), juga dapat ditemukan adanya peningkatan bermakna berat badan rata-rata mencit Kelompok Diberi Pangan Pembanding (KLPP) antara minggu ke-0 dan minggu ke-8 ($p = 0.033$). Kenaikan berat badan rata-rata mencit ini memang cukup signifikan, tetapi masih dapat dirancu oleh faktor penambahan usia mencit.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada jumlah leukosit mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.
2. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada hampir seluruh distribusi jenis leukosit (kecuali sel batang) mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid. Terdapat perbedaan bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada jumlah sel batang mencit periode minggu ke-4 dan ke-8. Kelompok pangan darurat BPPT memiliki jumlah sel batang lebih tinggi daripada kelompok ekstrak *Phyllanthus niruri*.
3. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG total mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid.
4. Terdapat perbedaan bermakna secara statistik antara efek pangan darurat BPPT dengan efek ekstrak *Phyllanthus niruri* pada kadar IgG spesifik antitetanus toksoid mencit dalam kondisi lapar yang telah diberi pajanan tetanus toksoid pada periode minggu ke-4 dan ke-8. Kelompok ekstrak *Phyllanthus niruri* memiliki kadar IgG spesifik antitetanus toksoid lebih tinggi daripada kelompok pangan darurat BPPT.

5.2. Saran

1. Melakukan penelitian dengan dosis polifenol yang berbeda-beda untuk dapat mengetahui dosis polifenol yang paling efektif.

2. Melakukan pemeriksaan kadar polifenol dalam darah mencit sehingga dapat diketahui dosis polifenol dalam pangan darurat BPPT yang dapat mempengaruhi sistem imun.
3. Melakukan pemeriksaan IL-2, IL-4, dan sitokin lainnya untuk melihat efek polifenol dalam pangan darurat BPPT terhadap sistem imun dengan lebih akurat.
4. Mengatur jumlah mencit dalam satu kandang sesuai standar yang ada untuk mencegah kemungkinan mencit berebut makanan dan kemungkinan penularan penyakit.
5. Menjaga kebersihan kandang mencit untuk mencegah kemungkinan infeksi pada mencit yang dapat memengaruhi sistem imun dan hasil penelitian.
6. Melakukan pengukuran dan analisis hematologi dan ELISA pada setiap minggu setelah pemberian paparan tetanus toksoid sehingga dapat mengetahui kenaikan kadar IgG total dan IgG spesifik anti-TT dengan lebih detail.
7. Menggunakan kit ELISA kuantitatif untuk memeriksa kadar IgG spesifik antitetanus toksoid sehingga hasil yang didapatkan dapat lebih mencerminkan sistem imun.

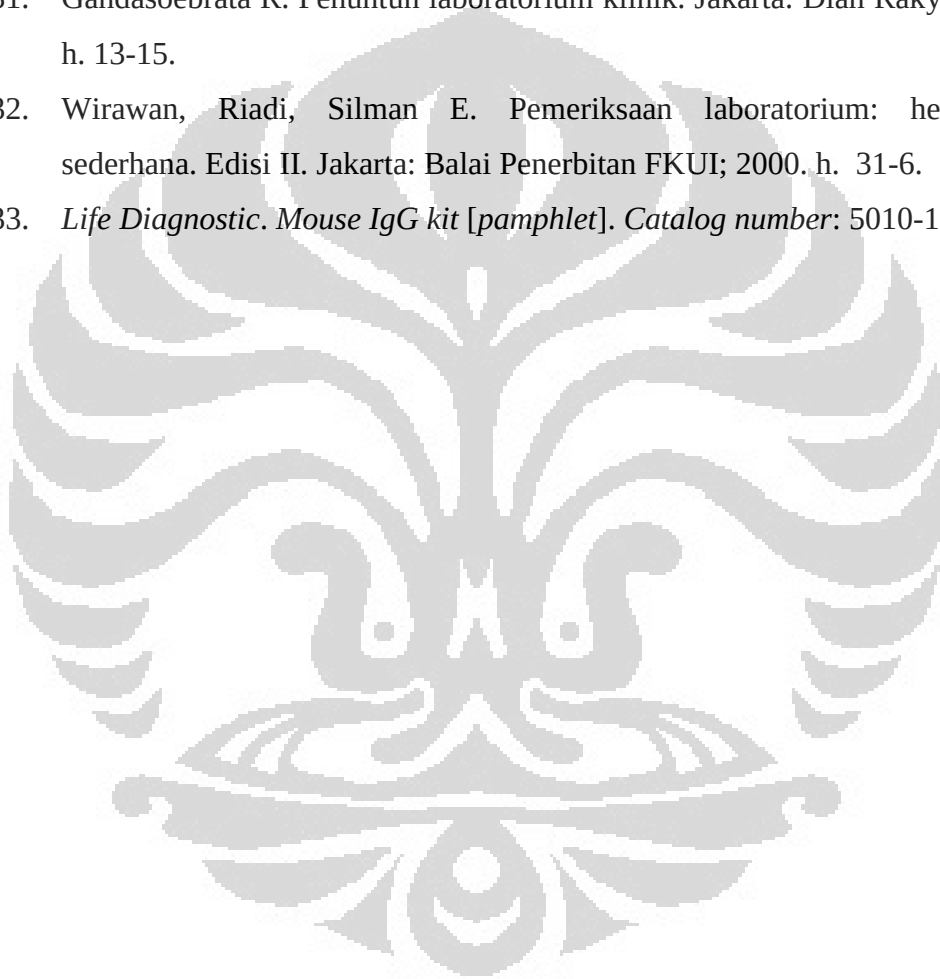
DAFTAR PUSTAKA

1. Sherwood L. *Human physiology: from cells to system*. Edisi VI. Belmont: Thomson Brooks/Cole; 2007. h. 409-47.
2. Matondang CS. Perkembangan sistem imun. Dalam: Akib AA, Munasir Z, Kurniati N, editor. Buku ajar alergi imunologi. Edisi II. Jakarta: IDAI; 2008. h. 7-13.
3. Patu I. Arti definisi/pengertian imunisasi, tujuan, manfaat, cara, dan jenis imunisasi pada manusia [Internet]. Cpddokter; c2008 [diakses tanggal 17 Januari 2010]. Diunduh dari: http://cpddokter.com/home/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=788.
4. Mkrtychan M, Ghochikyan A, Movsesyan N, Karapetyan A, Begoyan G, Glenn GM, dkk. *Immunostimulant adjuvant patch enhances humoral and cellular immune response to DNA immunization* [Internet]. NCBI; c2008 [diakses tanggal 17 Januari 2010]. Diunduh dari: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2478559/>.
5. Dexa Medica. Immunomodulator naik daun setelah isu SARS dan flu burung [Internet]. Stimuno; c2006 [diperbaharui tanggal 3 Agustus 2006; diakses tanggal 19 Desember 2010]. Diunduh dari: <http://www.stimuno.com/index.php?mod=press&id=51>.
6. Mrunal DC, Sohil GH, Ashwini JA, Krithika R, Saloni V. *Phyllanthus niruri* [Internet]. *Pharmainfo*; c2008 [diakses tanggal 2 Desember 2009]. Diunduh dari: <http://www.pharmainfo.net/reviews/phyllanthus-niruri>.
7. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Imunoyoi, solusi pangan darurat [Internet]. BPPT; c2009 [diperbaharui tanggal 28 September 2009; diakses tanggal 29 Juli 2011]. Diunduh dari: http://www.bppt.go.id/index.php?option=com_content&view=article&id=245%3Aimunoyoi-solusi-pangan-darurat&catid=45%3Aberitasingkat&Itemid.

8. Konsep Dasar Immunologi [Internet]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2007 [diakses tanggal 24 September 2009]. Diunduh dari: <http://www.ners.unair.ac.id/materikuliah/DASAR%20IMUNOLOGI.pdf>.
9. Baratawidjaja KG. Immunologi dasar. Edisi V. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2002. h. 372-90.
10. Sjahrurachman A. Pemberian terapi imunomodulator herbal [Internet]. HTA; 2004 (diakses tanggal 29 September 2009). Diunduh dari http://www.google.co.id/url?sa=t&source=web&ct=res&cd=1&ved=0CAkQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.yanmedik-depkes.net%2Fhta%2FHasil%2520Kajian%2520HTA%2F2004%2FPemberian%2520Terapi%2520Imunomodulator%2520Herbal.doc&rct=j&q=Thyagarajan+dkk+%281988%29+XinHua+dkk.+%282001%29+&ei=wDdPS_OeL47i7AO3i_S2CA&usg=AFQjCNEPGFtobh44Fc5mglzJUpwnizobpw.
11. Permadhi I, Sukmaniah S. *Diet, immune, and infection* [slide kuliah yang tidak dipublikasikan]. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: Departemen Gizi Klinik; kuliah diberikan tanggal 15 April 2011.
12. Neyestani TR. *Polyphenols and immunity*. Dalam: Meester FD, Watson RR, editor. *Wild-type food in health promotion and disease prevention*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2008. h. 413-28.
13. Chen CM, LI SC, Lin YL, Hsu CY, Shieh MJ, Liu JF. *Consumption of purple sweet potato leaves modulates human immune response: T-lymphocyte functions, lytic activity of natural killer cell, and antibody production*. *World J Gastroenterology*. 2005;11:5777-81.
14. Alvarez P, Alvarado C, Mathiu F, Jimenez L, Fuente MDL. *Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several function and the redox state of mouse leucocytes*. *Eur J Nutr*. 2006;45:428-38.
15. Kiemer AK, Hartung T, Huber C, and Vollmar AM. *Phyllanthus amarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF- κ B pathway*. *Journal of Hepatology. Sciencedirect*. 2009;38:89.

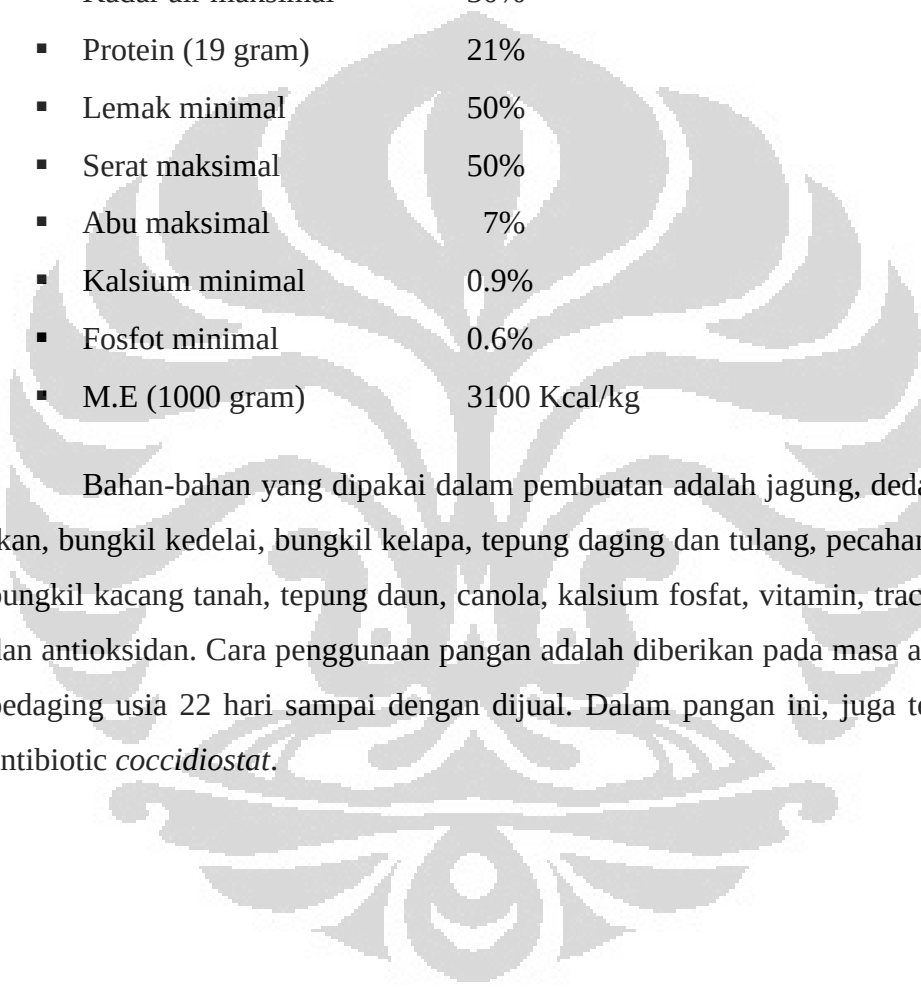
16. Center for disease control and prevention. *Information about disease and vaccines* [Internet]. *Immunize*; c2009 (diakses tanggal 26 September 2009). Diunduh dari: <http://www.immunize.org/catg.d/p4220.pdf>.
17. Stabley A, Walter AO. *Vaccine* [e-book]. Edisi IV. Philadelphia: *Saunders*; 2004. h. 755-7.
18. Melayer S, Laumer M, Mackensen A, Andreesen R, Krause SW. *Analysis of immune response against tetanus toxoid: enumeration of specific T helper cells by the elispot assay*. *Immunobiology*. 2002;205:282-9.
19. OECD. *Guideline for testing of chemicals*. 401: *acute oral toxicity*. 1981:401.
20. OECD. *Guideline for testing of chemicals*. 408: *subchronic oral toxicity-rodent: 90-day study*. 1981:408.
21. Derelanko MJ. *Handbook of toxicology* [e-book]. Edisi II. New York: *CRC Press*; 2002.
22. Aceanimals. *BALB-C strain* [Internet]. *Aceanimals*; c2008 (diakses tanggal 24 April 2010). Diunduh dari: <http://www.aceanimals.com/BalbC.htm>.
23. *Harlan's Laboratory*. *Bagg's Albino: BALB/C* [Internet]. *Harlan Laboratories*; c2008 (diakses tanggal 24 April 2010). Diunduh dari: <http://www.harlan.com/download.axd/bbfa4d65a7914e2e8359ff4bf1bbc252.pdf?d=Balbc>.
24. ILAR (*Institute of Laboratory Animal Resources*) *Committee on Care and Use of Laboratory Animals*. *Guide for the care and use of laboratory animals*. NIH Pub. 1985;86:23.
25. ILAR (*Institute of Laboratory Animal Resources*) *Committee on Standards*. *Standards for the breeding, care, and management of laboratory rabbits*. Washington DC: *National Academy of Science/National Research Council*; 1965.
26. ILAR (*Institute of Laboratory Animal Resources*) *Committee on Rodents*. *Laboratory animal management: rodents*. ILAR news. 1977;20:L1-15.
27. Gay WI. *Methods of animal experimentation*. Volume I. New York: *Academic Press*; 1965. h. 174-91.

28. Gay WI. *Methods of animal experimentation. Volume I.* New York: *Academic Press*; 1965. h. 50-62.
29. Henry, John B. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods: basic examination of blood and bone marrow* [e-book]. Edisi XXI. China: *Elsevier*; 2006.
30. Wirawan, Riadi, Silman E. *Pemeriksaan laboratorium: hematologi sederhana.* Edisi II. Jakarta: Balai Penerbitan FKUI; 2000. h. 15-23.
31. Gandasoebrata R. *Penuntun laboratorium klinik.* Jakarta: Dian Rakyat; 1989. h. 13-15.
32. Wirawan, Riadi, Silman E. *Pemeriksaan laboratorium: hematologi sederhana.* Edisi II. Jakarta: Balai Penerbitan FKUI; 2000. h. 31-6.
33. *Life Diagnostic. Mouse IgG kit* [pamphlet]. *Catalog number*: 5010-1.



LAMPIRAN 1**Pangan BR2 (CP 512-B)**

Pangan BR2 merupakan pakan komplit butiran masa akhir ayam pedaging yang memiliki komposisi sebagai berikut:



▪ Kadar air maksimal	30%
▪ Protein (19 gram)	21%
▪ Lemak minimal	50%
▪ Serat maksimal	50%
▪ Abu maksimal	7%
▪ Kalsium minimal	0.9%
▪ Fosfor minimal	0.6%
▪ M.E (1000 gram)	3100 Kcal/kg

Bahan-bahan yang dipakai dalam pembuatan adalah jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, tepung daun, canola, kalsium fosfat, vitamin, trace mineral, dan antioksidan. Cara penggunaan pangan adalah diberikan pada masa akhir ayam pedaging usia 22 hari sampai dengan dijual. Dalam pangan ini, juga terkandung antibiotik *coccidiostat*.

LAMPIRAN 2

▼ *Dummy Table* Perbandingan Kedua Kelompok Perlakuan Pada Parameter Respon Imun

Kelompok	Parameter Respon Imun			
	Jumlah Leukosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Jenis Leukosit	Kadar IgG Total (ng/mL)	Kadar IgG Spesifik
KLPU 0-4				
KLPP 0-4				
KLPU 4-8				
KLPP 4-8				

Keterangan:

▼ *Dummy Table* Perbandingan Kedua Kelompok Perlakuan Pada Data Tambahan

Kelompok	Data Tambahan		
	Jumlah Eritrosit ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (gr/dL)	Kenaikan Berat Badan
KLPU 0-4			
KLPP 0-4			
KLPU 4-8			
KLPP 4-8			

Keterangan:

KLPU 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPP 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPU 4-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-8 dan minggu ke-4; KLPP-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-8 dan minggu ke-4.

LAMPIRAN 3

▼ **Tabel Distribusi Data Perhitungan Jumlah dan Jenis Leukosit, Kadar IgG Total, dan Kadar IgG Spesifik.**

Kelompok	Shapiro-Wilk Sig.								
	Leukosit	Basofil	Eosinofil	Batang	Segmen	Limfosit	Mono-sit	IgG Total	IgG Spesifik
KLPU 0-4	0.060	1	0.746	0.787	0.579	0.039	0.020	0.926	0.620
KLPP 0-4	0.282	1	0.186	0.611	0.538	0.081	0.176	0.718	0.807
KLPU 4-8	0.042	1	0.661	0.086	0.505	0.519	0.850	0.493	0.814
KLPP 4-8	0.114	1	0.016	0.922	0.334	0.444	0.673	0.794	0.708

▼ **Tabel Distribusi Data Perhitungan Jumlah Eritrosit, Kadar Hemoglobin, dan Kenaikan Berat Badan.**

Kelompok	Shapiro-Wilk Sig.		
	Sel Darah Merah	Hemoglobin	Kenaikan berat Badan
KLPU 0-4	0.639	0.459	0.899
KLPP 0-4	0.638	0.691	0.636
KLPU 4-8	0.457	0.097	0.104
KLPP 4-8	0.789	0.119	0.274

Keterangan:

KLPU 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPP 0-4 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-4 dan minggu ke-0; KLPU 4-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Uji periode minggu ke-8 dan minggu ke-4; KLPP-8 = Selisih Nilai dari Kelompok Lapar diberi Pangan Pembanding periode minggu ke-8 dan minggu ke-4.

LAMPIRAN 4**Lembar Pernyataan dan Pengesahan****Pernyataan Peneliti**

Dengan ini kami menyatakan:

Penelitian dengan judul seperti pada halaman ii merupakan penelitian orisinal bukan plagiat.

Peneliti	Tanda Tangan	Tanggal
Jessica Octaviani		11 Agustus 2011

Pengesahan Ketua Penanggung Jawab Modul Riset dan Pembimbing yang Bertanggung Jawab

Nama penanggung jawab modul riset	Tanda Tangan
Dr. dr. Saptawati Bardosono, MS	
Nama pembimbing	Tanda Tangan
Dr. Alida Roswita Harahap DMM, SpPK, PhD	
Nama narasumber	Tanda Tangan
Prof. Dr. Dr. Purwastyastuti, Sp.FK	