



**PENGARUH EKSTRAK *Hedyotis corymbosa*
TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT *Balb/c*
YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium***

KARYA TULIS ILMIAH

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat
dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana
Fakultas Kedokteran

Disusun oleh :
Damayanti
NIM : G2A 002 048

UNIVERSITAS DIPONEGORO

FAKULTAS KEDOKTERAN

HALAMAN PENGESAHAN

Telah disetujui oleh dosen pembimbing, Usulan Penelitian Karya Tulis Ilmiah dari :

Nama : Damayanti
NIM : G2A 002 048
Fakultas : Kedokteran
Universitas : Diponegoro, Semarang
Tingkat : Program Pendidikan Sarjana
Bagian : Histologi
Judul : Pengaruh Pemberian Ekstrak *Hedyotis corymbosa* Terhadap Aktifitas Fagositosis Makrofag Mencit *Balb/c* Yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi persyaratan dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana Kedokteran.

Semarang, 22 Oktober 2005

Reviewer

Pembimbing

dr. Edi Dharmana, M.sc,Ph.D, Sp. ParK
(NIP. 131.916.041)

dr. Neni Susilaningsih, M.Si
(NIP. 131. 832. 243)_

SEMARANG

2006

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK HEDYOTIS CORYMBOSA TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT *Balb/c* YANG DIINFEKSI *Salmonella Typhimurium*

Damayanti,* Neni Susilaningsih**

ABSTRAK

Latar Belakang : *Hedyotis corymbosa* dapat menjadi pilihan pengobatan demam tifoid karena mengandung bahan *flavonoid* yang dipercaya sebagai imunomodulator dengan cara meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan anti bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan peran *Hedyotis corymbosa* dalam meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Metode : Penelitian ini merupakan *penelitian eksperimental* dengan rancangan *the post test only control group design*. Sampel 30 ekor mencit *Balb/c* jantan dengan kriteria spesifik, dibagi secara acak menjadi 6 kelompok: K1 (tidak diberikan perlakuan apapun); K2 (diinfeksi *Salmonella typhimurium*); K3 (diberi ekstrak 80mg *Hedyotis corymbosa*); P1, P2, P3 (diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada hari ke 10 dan diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* dengan dosis 24mg; 80mg; dan 240mg per hari) selama 14 hari. Hari ke 15 dilakukan isolasi makrofag dan dihitung index fagositosisnya yaitu presentase sel yang memfagosit latex pada 200 sel makrofag kali jumlah rata-rata partikel latex pada sel yang positif.

Hasil : Rerata index fagositosis untuk masing-masing kelompok : K1=0,49, K2=0,92, K3=0,95, P1=0,65, P2=0,88, P3=1,60. Uji beda antar kelompok yang mempunyai perbedaan bermakna : K1-P3, K2-P3, P1-P3 dengan $p=0,009$ dan P2-P3 dengan $p=0,047$.

Kesimpulan : *Hedyotis corymbosa* dosis 240mg dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Kata Kunci : Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*), fagositosis makrofag, mencit *Balb/c*

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

**Staf Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

THE EFFECT OF HEDYOTIS CORYMBOSA ON MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS ACTIVITY OF Balb/c MICE INFECTED WITH Salmonella Typhimurium

Damayanti,* Neni Susilaningsih **

ABSTRACT

Background: *Hedyotis corymbosa* can be used as typhoid treatment because it contains flavonoid, that is believed have immunomodulator effect by increasing phagocytosis of macrophage and anti-microbial. This study is to provide evidence that *Hedyotis corymbosa* is increasing the activity of macrophage phagocytosis of *Balb/c* mice infected with *Salmonella typhimurium*

Method: This study was an experiment research with the post test only control group design. Samples were 30 male *Balb/c* mice with specific criteria randomly allocated into 6 groups: K1 (without any treatments); K2 (infected with *Salmonella typhimurium*); K3 (treated with 80mg *Hedyotis corymbosa*); P1,P2,P3 (infected by *Salmonella typhimurium* on 10th days and treated with 24mg, 80mg, 240mg *Hedyotis corymbosa* extract each day) for 14 days. On 15th days macrophages isolation was done and measured phagocytosis index. Phagocytosis index was cell percentage phagocytosing latex on 200 of macrophage cell multiplied with latex's particle mean on positive cell

Result: Mean of Phagocytosis index: K1=0.49, K2=0.92, K3=0.95, P1=0.65, P2=0.88, P3=1.60. The comparison of groups had significant outcomes were: K1-P3, K2-P3, P1-P3 with $p=0.009$ and P2-P3 with $p=0.047$. The others didn't have significant outcome ($p>0.05$).

Conclusion: *Hedyotis corymbosa* 240mg dose has an effect to increase macrophage phagocytosis activity of Balb/c mice infected with *Salmonella typhimurium*.

Keywords: Pearl grass (*Hedyotis corymbosa*), macrophage phagocytosis, Balb/c mice

*Medical student of Diponegoro University Semarang

**Lecturer in Departement of Histology Medical Faculty of Diponegoro University

PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan masalah serius di Indonesia. Penyakit ini di Indonesia bersifat sporadik endemik dan timbul sepanjang tahun. Di Palembang dari penelitian retrospektif selama periode 5 tahun (1990-1994) didapatkan sebanyak 83 kasus (21,5%) penderita demam tifoid dengan hasil biakan darah *salmonella* positif dari penderita yang dirawat dengan klinis demam tifoid.¹ Banyak penduduk Indonesia memilih pengobatan tradisional untuk mengurangi konsumsi akan bahan-bahan kimia dan untuk menghemat pengeluaran. Agar obat tradisional dapat dipakai secara efektif dan aman maka diperlukan suatu penelitian.

Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) salah satu bahan obat tradisional dengan khasiatnya antiradang, antibakteri, antipiretik, mengaktifkan sirkulasi darah serta antiinflamasi.^{2,3} Bukan hanya itu saja, berdasarkan beberapa penelitian kandungan kimia yang terdapat pada *Hedyotis corymbosa* yaitu antara lain flavonoid, oleanic acid dan ursolic acid berpotensi dalam efek hepatoprotektif, hipokolesterolemia, antispasmodik, anti tumor serta meningkatkan aktivitas sistem imun.^{4,5}

Sel – sel pada sistem imun yang berperan dalam pertahanan seluler non spesifik adalah sel fagosit, makrofag, sel NK dan sel K. Zat asing atau antigen yang tidak spesifik akan dihancurkan dengan proses fagositosis oleh sel-sel tersebut sehingga dapat mencegah timbulnya penyakit. Dalam kerjanya sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik yaitu limfosit B dan limfosit T.^{6,7,8}

Salmonella typhimurium merupakan bakteri intraseluler yang pathogen pada manusia dan hewan bila masuk melalui mulut.⁹ Salah satu ciri bakteri intraseluler fakultatif adalah dapat hidup dan berkembangbiak dalam fagosit. Karena mikroba ini menemukan tempat untuk bersembunyi sehingga tidak terjangkau oleh antibodi dalam sirkulasi, maka untuk mengeliminasinya diperlukan mekanisme imunitas seluler.^{10,11} Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri dimulai dengan proses fagositosis oleh makrofag yang kemudian diikuti dengan pembunuhan kuman (*bacterial killing*).¹¹ Bakteri intraseluler menstimulasi produksi IL-12 yang mengaktifkan sel NK, menstimulasi perkembangan sel Th-1 dan mengaktifkan sel T CD8⁺. Ketiga jenis sel yang teraktifkan tersebut mensekresikan Interferon- γ (*IFN- γ*) yang mengaktifkan makrofag sehingga makrofag tersebut dapat membunuh bakteri intraseluler.¹¹

Hedyotis corymbosa diyakini dapat meningkatkan sistem imunitas tubuh yaitu sebagai imunostimulator.⁵

Namun belum banyak penelitian lebih lanjut yang dilakukan untuk membuktikannya. Dengan alasan ini, maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa *Hedyotis corymbosa* berperan untuk meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Histologi dan laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama kurang lebih 3 bulan. Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental laboratorik* dengan rancangan *the post test only control group design* pada hewan coba mencit *Balb/c*.

Populasi target penelitian ini adalah mencit strain *Balb/c* jantan, umur 8-10 minggu, berat badan 20-25 gram, sehat, tidak ada kelainan anatomi yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas UGM Yogyakarta. Sampel penelitian diambil sesuai dengan kriteria inklusi, dilakukan secara acak (random) dari populasi. Besar sampel penelitian berdasarkan *Research Guidelines For Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicine*, yaitu tiap kelompok perlakuan minimal 5 mencit.¹² Besar sampel yang diperlukan untuk penelitian ini adalah 30 ekor mencit yang dikandangan menurut masing-masing kelompok di Bagian Biokimia.

Bahan – bahan yang diperlukan dalam penelitian ini terdiri dari : mencit strain *Balb/c* betina (PAU UGM), ekstrak rumput mutiara, pakan mencit standar berupa pellet dan minuman mencit, bahan/alat untuk isolasi makrofag peritoneal mencit (lihat lampiran 1), serta bahan/alat untuk pemeriksaan fagositosis latex pada makrofag (lihat lampiran 2).

Sebelum penelitian, 30 ekor mencit yang sudah dibagi dalam 6 kelompok diadaptasikan selama 1 minggu dengan tidak diberi perlakuan kecuali mendapat pakan standar dan minum yang sama *ad libitum*. Enam kelompok tersebut terdiri dari kelompok K1 yang tidak diberi perlakuan, K2 diinfeksi *Salmonella typhimurium*

10^3 CFU, K3 diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* 80mg/sonde serta kelompok P1,P2,P3 yang diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* dengan dosis berturut-turut 24mg/sonde, 80mg/sonde, 240mg/sonde dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* 10^3 CFU pada hari ke 10.

Pengamatan dilakukan sampai 14 hari, kemudian dilakukan *killing* mencit di Laboratorium Bioteknologi. Masing-masing mencit diisolasi makrofagnya dari rongga peritoneum, selanjutnya fagositosis makrofag diperiksa dengan Latex Beads.¹³ Setelah itu perhitungan kemampuan fagositosis makrofag dapat dikerjakan yaitu presentase sel yang memfagosit latex pada 200 sel makrofag kali jumlah rata-rata partikel latex pada sel yang positif dan dinyatakan sebagai index fagositosis.¹³

Data dianalisa secara deskriptif untuk menghitung nilai rata-rata kemudian hasil disajikan dalam bentuk tabel dan grafik *Box-plot*. Data yang diperoleh diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk*. Oleh karena data yang diperoleh berupa distribusi tidak normal maka uji selanjutnya menggunakan *Kruskall-Wallis* dan setelah diperoleh perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*. Taraf signifikansi diterima bila nilai $p \leq 0,05$. Pengolahan dan analisa data menggunakan program SPSS for Windows version 13.00.

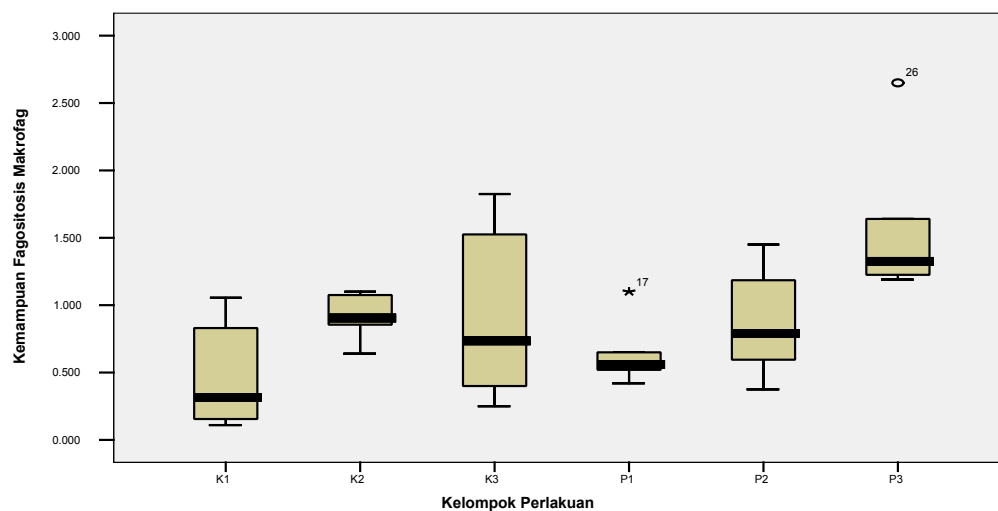
HASIL

Perhitungan Index Fagositosis Makrofag masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel 1 dan grafik.

Tabel 1. Index Fagositosis Makrofag pada tiap kelompok perlakuan

	Rerata	Simpang baku
K1	0,49	0,4
K2	0,92	0,2
K3	0,95	0,7
P1	0,65	0,3

P2	0,88	0,4
P3	1,60	0,6



Grafik 1. Kemampuan Fagositosis Makrofag pada tiap kelompok perlakuan.

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa rerata kemampuan fagositosis makrofag untuk kelompok K1 lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok K2 dan K3, demikian pula rerata kemampuan fagositosis makrofag kelompok P1 lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok P2 dan P3.

Hasil di atas kemudian kita analisa dengan uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan antar masing-masing variabel. Dari uji *Kruskal Wallis* didapatkan hasil $p=0.035$ yang berarti ada perbedaan yang bermakna antar masing-masing variabel. Selanjutnya dilakukan uji *Mann Whitney U* untuk membandingkan 2 sampel yang independent, didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 2. Nilai p uji non parametric *Mann Whitney U*

	K1	K2	K3	P1	P2	P3
K1	-	0,076	0,251	0,347	0,175	0,009*
K2	0,076	-	0,754	0,142	0,754	0,009*
K3	0,251	0,754	-	0,754	0,917	0,251
P1	0,347	0,142	0,754	-	0,347	0,009*
P2	0,175	0,754	0,917	0,347	-	0,047*
P3	0,009*	0,009*	0,251	0,009*	0,047*	-

* Ada perbedaan yang bermakna

Dari tabel di atas dapat dilihat adanya perbedaan yang bermakna yaitu antara kemampuan fagositosis makrofag kelompok K1-P3 ($p=0,009$), K2-P3 ($p=0,009$), P1-P3 ($p=0,009$), P2-P3 ($p=0,047$).

PEMBAHASAN

Dari uji *Kruskal Wallis* index fagositosis makrofag antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan didapatkan hasil yang bermakna ($p=0,035$). Tampak peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada kelompok perlakuan yang diberi *Hedyotis corymbosa* dan diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Hal ini dikarenakan *Hedyotis corymbosa* mengandung *flavonoid* dengan efek meningkatkan sistem imun dan anti bakteri yang salah satunya diperankan oleh fagositosis makrofag.⁵

Pada mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* juga mempunyai usaha pertahanan tubuh dengan mengaktifkan *sel natural killer (sel NK)* untuk memproduksi *interferon- γ (IFN- γ)* sehingga dapat meningkatkan aktifitas bakterisidal makrofag dalam melawan bakteri ini.⁸ Selain itu, produksi *Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)* oleh makrofag juga memainkan peranan penting terhadap pertahanan *hospes* dengan mengaktifasi kemampuan *bakterisidal* makrofag terhadap *Salmonella typhimurium*. Jadi kerjasama antara *IFN- γ* dan *TNF- α* akan meningkatkan kemampuan bakterisidal fagositosis makrofag terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*.⁸

Perbandingan antar masing-masing kelompok yang menghasilkan perbedaan bermakna hanya antara kelompok K1-P3, kelompok K2-P3, kelompok P1-P3 serta P2-P3. Hal ini disebabkan oleh beberapa factor antarlain dosis yang digunakan oleh kelompok perlakuan bukanlah dosis efektif namun merupakan dosis yang masih biasa digunakan dalam sehari-hari, sedangkan dosis efektif *Hedyotis corymbosa* belum ditemukan.

Dari grafik *Box-plot* terlihat penurunan kemampuan fagositosis makrofag anatara kelompok K2-K3 dan K2-P1 yang tidak bermakna. Hal ini disebabkan oleh ada banyak jenis *flavonoid*, salah satunya adalah *isoflavone* yang mempunyai efek menghambat oksidasi makrofag pada lipoprotein densitas rendah.¹⁴ Selain itu juga terdapat keterbatasan pada pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop cahaya yang hanya mampu melihat benda dalam 2 dimensi sehingga sangat sulit untuk membedakan partikel latex berada di dalam atau di luar sel, oleh karena itu diharapkan untuk penelitian selanjutnya pemeriksaan dapat menggunakan dua pewarnaan yang berbeda agar dapat membedakan partikel latex yang berada di dalam maupun di luar sel makrofag, atau dengan pencucian menggunakan zat yang dapat melisis partikel latex yang tidak difagosit makrofag.

KESIMPULAN

Hedyotis corymbosa dengan dosis 240mg dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

SARAN

Diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak *Hedyotis corymbosa*:

- Dengan dosis pemberian ekstrak yang lebih bervariasi untuk mengetahui dosis efektif. Hal ini dikarenakan dosis efektif *Hedyotis corymbosa* memang belum ditemukan.
- Dengan periode waktu pelaksanaannya yang berbeda-beda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa atas segala bimbingan dan kasihNYA selama penelitian dan penyusunan serta pelaksanaan KTI ini.
2. Orang tua serta keluarga peneliti yang telah memberikan dukungan, doa, dana, dan cinta kasih yang besar.
3. dr. Neni Susilaningsih, Msi, selaku dosen pembimbing, yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan selama penelitian dan penyusunan serta pelaksanaan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. dr. Ratna Damma P, M.Kes, yang telah memberikan bimbingan dalam kelancaran proses penelitian.
5. Kepala Bagian Histologi, yang telah membantu fasilitas laboratorium Histologi.
6. Direktur Utama Laboratorium Bioteknologi F.K. UNDIP
7. Mbak Wiwik, mbak Lucy, mbak Nanik, dll selaku staf Laboratorium bioteknologi FK UNDIP yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
8. Pak Kasiman dan Pak Dukut, yang telah membantu memelihara mencit.
9. Angkatan 2002, teman-temanku sekelompok (viola, windy R, david) untuk semangat, kerjasama ,

konflik, dan kebersamaan sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik serta semua pihak yang bersangkutan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sya'roni Akmal. Perkembangan Penatalaksanaan Demam Tifoid (Accesed on September 2005)
Available at http://www.b.domaindx.com/smart_doctor.
2. Rumput Mutiara Mengaktifkan Sirkulasi Darah (Accesed on September 2005)
Available at Republika Online-<http://www.republika.co.id>.
3. Tanaman Obat Indonesia, Rumput Hedyotis corymbosa. (Accesed on September 2005)
Available at http://www.iptek.net.id/ind/cakra_obat/tanamanobat.php.
4. Constituent : flavonoid. (Accesed on June 2006)
Available at http://www.phytotherapies.org/constituent_cfm?id=61
5. Hsu H Y. Tumor inhibition by several components extracted from Hedyotis corymbosa and Hedyotis

diffusa. (Accesed on September 2005)

Availabe at <http://www.cancerprev.org/journal?Issues?22/101/28/2864>

6. Baratawidjaja K. Immunologi Dasar, Dalam buku : Sarwono, Waspadji S. editor. Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, 1996.
7. Soebowo. Immunologi Klinik. Bandung : Angkasa, 1993 : 134-8
8. Keuter M. Mediators in typhoid fever clinical experimental studies (thesis). Netherlands : Katholieke Universiteit Nijmegen, 1998 : 1-29.
9. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi ke-20. Jakarta : EGC, 1996 : 247
10. Kresno SB. Immunologi : Diagnosis dan prosedur laboratorium. Edisi kedua. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, 1991
11. Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, Fifth Edition. Philadelphia : WB Saunders Company, 1994 : 97 – 114.
12. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila: Regional Office for The Western Pasific. 1993 : 35.
13. Coligan JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, Shevach EM, Stober W. Current protocols in immunology, Vol.2. New York-Singapore : A Jhon Wiley & Sons, Inc, 2000: 14.1.1-14.1.3,14.6.3-14.6.5
14. Busey Philip. Flavonoids and vascular disease. (Accesed on September 2005). Availabe at <http://www.enzo.co.nz/antiox.html>
15. Lewis, James G. Isolation of Macrofag : in Burlson, Gary R. et al. Methods in Immunotoxicology, Vol.2. New York-Singapore : A John Wiley & Sons, Inc, 2000: 19-21

LAMPIRAN 1

PROSEDUR ISOLASI MAKROFAG MENCIT

Metode Ding (1994) dan Lewis (1995)

Untuk mendapatkan $1-3 \times 10^6$ sel/ml

Alat :

1. Gunting dan pinset
2. Semprit 10 ml steril dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge
3. Tabung sentrifus 50 ml steril
4. Pipet Pasteur steril
5. Tabung berlapis silikon
6. Hemacytometer
7. Laminar flow hood
8. Refrigerated centrifuge

Bahan :

1. Sodium pentobarbital, 50 mg/ml
2. Ethanol, 70% (v/v)
3. Free Hank's balanced salt solution (CMF-HBSS), mengandung Ca^{2+} dan Mg^{2+} (GIBCO)
4. Asam acetate 3% (v/v) + crystal violet 1 mg/100ml
5. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (GIBCO)
6. Fetal Bovine Serum, FBS
7. Glutamin (GIBCO)
8. Penicillin-Streptomycin (GIBCO)

Prosedur Isolasi Makrofag Mencit:¹⁵

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi servikal, dibaringkan terlentang dan seluruh permukaan ventral disiram alkohol 70%.
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas, dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan alcohol 70% untuk menyingkirkan bulu – bulu yang rontok.
3. Injeksikan 2-3 ml CMF-HBSS dalam rongga peritoneum.
4. Dengan ujung jarum menghadap ke atas/ventral, peritoneum dipijat pelan. Injeksikan 7-8 ml CMF-HBSS. Sedot kembali cairan dalam rongga peritoneum sampai habis, bila masih ada sisa cairan dihisap menggunakan pipet Pasteur steril. Masukkan cairan ke dalam tabung berlapis silicon.
5. Cairan disentrifuse 800 xg pada suhu 20° C selama 5 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, maka cuci sel-sel tersebut 2 kali menggunakan CMF-HBSS.
6. Makrofag dipurifikasi dengan cara menempatkan sel-sel peritoneal pada permukaan plastic selama 24 jam pada suhu 37° C, lalu tuang CMF-HBSS pelan-pelan untuk menghindari sediment pellet sel adheren ikut tertuang. Sel yang digunakan adalah sel yang adheren.
7. Tambahkan medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640 mengandung penicillin (50 U/ml), streptomycin (50µg/ml), glutamine (1mM) dan 10 % *FBS*.
8. Hitung sel-sel dengan Hemacytometer setelah dilarutkan dalam 3% asam acetate untuk melisiskan sel darah merah.
9. Kultur sel dalam medium komplit dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml selama 48 jam dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C.

LAMPIRAN 2

PROSEDUR PEMERIKSAAN FAGOSITOSIS MAKROFAG DENGAN LATEX BEADS

Bahan & Alat :

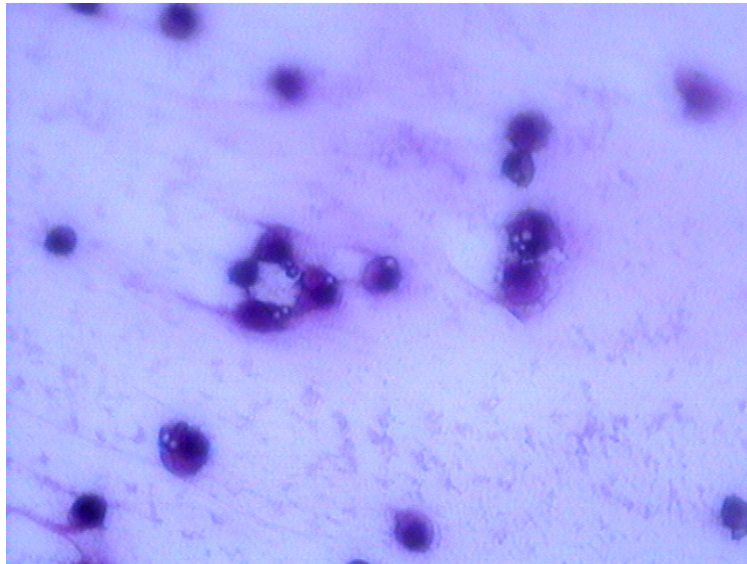
1. Makrofag

2. Latex Beads 3 μm (sigma. Cat. L30)
3. PBS
4. Rpmi
5. Microplate 2 well
6. Coverslip
7. Object glass
8. Inkubator CO₂
9. Mikroskop cahaya + kamera foto

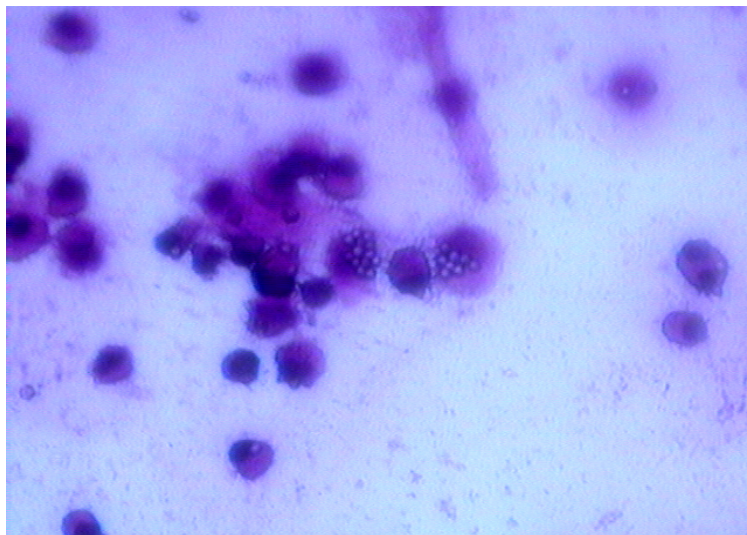
Prosedur Pemeriksaan:¹³

1. Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran diisi 200 μl (5×10^5 sel), diinkubasikan dalam incubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit.
2. Tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, inkubasikan selama 2 jam.
3. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali, kemudian tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, inkubasikan sampai 24 jam.
4. Makrofag peritoneum yang dikultur sehari sebelumnya, dicuci 2 kali dengan RPMI.
5. Latex beads diresuspensikan sehingga mendapat konsentrasi $2,5 \times 10^7/\text{ml}$.
6. Tambahkan suspensi latex 200 μl /sumuran, inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C, CO₂.
7. Cuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit.
8. Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan methanol absolut.
9. Setelah kering, *coverslips* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit.
10. Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar.
11. Setelah kering dilekatkan pada kaca benda.
12. Hitung kemampuan fagositosis makrofag setiap preparat dengan mikroskop cahaya, dengan pengulangan penghitungan 3 kali.

LAMPIRAN 3



KELOMPOK KONTROL



KELOMPOK PERLAKUAN