



**Pengaruh Pemberian Ekstrak Rumput mutiara ( *Hedyotis corymbosa* ) Dosis Bertingkat Terhadap Produksi NO Makrofag Mencit Balb/c**

**ARTIKEL ILMIAH**

Diajukan untuk Memenuhi Tugas dan Melengkapi Persyaratan  
dalam Menempuh Program Pendidikan Sarjana  
Fakultas Kedokteran.

**Disusun Oleh :**

**BRYANY TITI SANTI  
NIM : G2A 002 041**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG**

**2005  
LEMBAR PENGESAHAN**

**ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH**

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) Dosis Bertingkat Terhadap Produksi NO makrofag mencit Balb/c**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

**BRYANY TITI SANTI**

NIM : G2A002041

Telah dipertahankan didepan tim penguji KTI Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, pada tanggal 4 Agustus 2006 dan telah diperbaiki sesuai saran-saran yang diberikan.

Tim Penguji :

KA. MODERATOR  
PENGUJI

PENGUJI

dr Udadi Sadhana, M.Kes  
NIP 131 967 650

dr Noor Wijayahadi, M.Kes  
NIP 132 149 104

PEMBIMBING

dr. Ratna Damma P, M.Kes  
NIP 131 916 037

**Pengaruh pemberian ekstrak Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) dosis bertingkat terhadap produksi NO makrofag Mencit Balb/c.**

Bryany Titi Santi\*, Ratna Damma P\*\*

## ABSTRAK

**Pendahuluan** : Rumput mutiara (RM) telah lama digunakan untuk menyembuhkan penyakit infeksi. RM mengandung beberapa zat aktif diantaranya kaempferol yang dapat meningkatkan imunitas dengan merangsang sekresi IL-2 sehingga makrofag teraktivasi dan terjadi peningkatan produksi NO .

**Tujuan** : Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak RM dosis bertingkat terhadap produksi Nitrit Oksida (NO) makrofag pada mencit Balb/c.

**Metode**: Penelitian eksperimental (*post test only control group design*) dengan sample penelitian 20 ekor mencit *Balb/c*, dibagi menjadi 4 kelompok yang mendapat diet standart dan perlakuan, yaitu K, P1, P2, dan P3. Kelompok perlakuan diberi ekstrak RM 80 mg, 160 mg, dan 320 mg per hari selama 14 hari, selanjutnya mencit diterminasi, makrofag peritoneum diisolasi untuk mengukur produksi NO menggunakan elisa reader.

**Hasil** : Terjadi peningkatan produksi NO secara bermakna pada ekstrak RM dosis 80 mg, 160 mg, dan 320 mg jika dibanding K . Jumlah produksi NO pada dosis 320 mg lebih rendah dibanding dosis 80 mg dan 160 mg. Kemungkinan karena peningkatan NO dapat menghambat ekspresi iNOS.

**Kesimpulan** : Pemberian ekstrak RM dosis 80 mg, 160 mg, dan 320 mg meningkatkan produksi NO dengan perbedaan bermakna bila dibanding kontrol.

**Kata kunci** : Rumput mutiara, produksi NO makrofag, kaempferol, imunologi

\* Mahasiswa S1 Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

\*\* Staff Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

***The Effect of Rumpup mutiara (Hedyotis corymbosa) Extract by Multilevel doses on Production of Nitric oxide (NO) in Balb/c Mice's macrophage***

Bryany Titi Santi\*, Ratna Damma P\*\*

**ABSTRACT**

**Backgrounds :** Rumpup mutiara (RM) has been used as a therapy on infectious diseases for many years. RM contains many active substances, such as Kaempferol which able to increase immunity by triggers secretion of IL-2 which will activate macrophage and increase NO production

**Objective:** To identify the effect of multilevel doses RM extract toward NO production in Balb/c mice's peritoneal macrophage.

**Methods:** This was experimentally research using post test only goup design. The sample consist of 20 Balb/c mice randomly obtained. The sample was divided into 4 groups: K, P1, P2, and P3, which were administered with standard diet, RM extract dose 80 mg, 160 mg, and 320 mg every day. After 14 days those mice were terminated, then macrophage isolation from peritoneum cavity was conducted. Then, counts of NO production was performed using elisa reader .

**Results:** The group K compared to group P1,P2,P3 showed a very significant differences. NO production on dose 320 mg was the lowest value between dose 80 mg and 160 mg. This could be caused by the increasing of NO production suppreses iNOS expression.

**Conclusion:** There was a very significant differences among treatment groups doses 80 mg, 160 mg, and 320 mg towards control.

**Keywords:** Rumpup mutiara, NO production, kaempferol, immunology.

\* Undergraduate Student, Medical Faculty of Diponegoro University

\*\* Departement of Histology, Medical Faculty of Diponegoro University

**PENDAHULUAN**

Manusia memiliki sistem imun yang merupakan mekanisme pertahanan untuk melindungi dirinya. Sistem imun ini meliputi imunitas bawaan (non spesifik) dan imunitas adaptif (spesifik).<sup>1</sup> Makrofag memiliki peran penting dalam sistem imun seperti fagositosis dan produksi berbagai macam sitokin. Makrofag diaktivasi

oleh LPS (lipopolisakarida) bakteri, sel tubuh yang rusak/mati, IFN- $\gamma$  (interferon gamma).<sup>2</sup> Makrofag yang teraktivasi akan memakan bakteri intraseluler dan memproduksi lisosim, komplemen, hidrogen peroksida, nitrit oksida (NO), elastase dan kolagenase, IL-1, IL-12, IL-10, protrombin, dll.<sup>2</sup>

NO disintesa di dalam sel selama proses oksidasi L-arginine yang dikatalis oleh enzim *Nitric Oxide Synthase (NOS)*.<sup>3</sup> Proses tersebut membutuhkan *Flavin Adenin Dinucleotidase (FAD)*, *Flavin Mononucleotidase (FMN)*, NADP yang tereduksi (NADPH), dan bentuk tereduksi dari biopterin (BH<sub>4</sub>) sebagai kofaktor.<sup>3</sup> Proses ini juga berlangsung pada sel endotel pembuluh darah, neutrofil, platelet, dan makrofag. Ada tiga jenis NOS; endothelial cNOS, neuronal cNOS, dan inducible NOS (iNOS). NO yang dihasilkan fagosit saat teraktivasi diinduksi oleh iNOS.<sup>4</sup>

NO memiliki beberapa peran dalam tubuh seperti : vasodilatator, pengaturan tahanan vaskuler, agen antimikrobal.<sup>5</sup> Pada imunitas seluler yang diperankan oleh limfosit dan makrofag, NO menyumbangkan kemampuannya sebagai zat sitotoksik dalam proses fagositosis dengan cara bergabung bersama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untuk membentuk radikal peroksinitrit yang sangat reaktif membunuh mikroba.<sup>6</sup>

Kaempferol dapat mempengaruhi produksi NO. Kaempferol memiliki kemampuan imunomodulator dimana kaempferol dapat meningkatkan produksi IL-2 (interleukin 2).<sup>7</sup> IL-2 merangsang proliferasi dan diferensiasi sel T. Kemudian sel T berdiferensiasi menjadi Th1( T helper 1 ). Sel Th1 mensekresi berbagai macam produk seperti IFN- $\gamma$ , lymphotoxin, TNF ( Tumor Nekrosis Faktor ). IFN- $\gamma$  inilah yang potensial mengaktivasi makrofag dalam memproduksi berbagai macam zat dan sitokin termasuk NO.<sup>1,2</sup>

Rumput mutiara (RM) sudah sejak lama dikenal sebagai tanaman yang memiliki manfaat bagi kesehatan.<sup>8</sup> Dalam pengobatan modern Cina, RM digunakan untuk terapi carbuncle, luka terbuka pada kulit, sakit tenggorokan, bronchitis, infeksi pada organ-organ kelamin dan kandungan, hepatitis, kanker.<sup>9</sup> Zat – zat yang terkandung dalam RM antara lain : *ursolic acid*, *oleanic acid*, *flavanoid*, *hentriacontane*, *stigmasterol*, *betha-sistosterol*, *p-coumaric acid*.<sup>10</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa Flavanoid berpotensi meningkatkan produksi NO.<sup>11</sup> Salah satu jenis flavanoid yang dihasilkan dari proses isolasi RM adalah kaempferol.<sup>10</sup>

Pengaruh RM terhadap sistem imun secara keseluruhan masih belum jelas. Berdasarkan teori-teori diatas maka timbul rumusan masalah apakah ekstrak RM dalam dosis bertingkat dapat meningkatkan produksi NO

makrofag pada mencit Balb/c.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produksi NO makrofag pada mencit Balb/c yang diberi ekstrak RM dalam dosis bertingkat.

Diharapkan hasil penelitian ini dapat bermanfaat memberikan tambahan informasi mengenai pengaruh pemberian RM terhadap produksi NO makrofag, sehingga bermanfaat dalam pengembangan penelitian selanjutnya.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang selama kurang lebih 2 bulan. Ruang lingkup penelitian ini meliputi bidang Histologi dan Imunologi.

Rumput mutiara dalam bentuk kering didapatkan dari toko tanaman obat Karyasari Jakarta. Semua bagian Rumput mutiara diekstrak dengan metode Sokhletisasi dengan suhu sekitar 80C<sup>o</sup> dan menggunakan pelarut etanol 96% lalu pelarut ekstrak diuapkan secara evaporasi sampai berbentuk gel kemudian dilarutkan dalam aquades. Setiap dosis diberikan dalam 1 ml karena disesuaikan dengan kapasitas lambung mencit Balb/c.

Hasil ekstraksi dilakukan kromatografi lapis tipis dengan pelarut etil asetat kemudian disinari dengan sinar UV gelombang 365 menunjukkan adanya 8 jenis golongan zat aktif. KLT disemprotkan dengan FeCL<sub>3</sub> menimbulkan warna biru pada sebagian KLT. Hal ini menunjukkan adanya Flavanoid dalam ekstrak.

Berdasarkan tujuan yang hendak dicapai, maka jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan desain *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit Balb/c jantan berumur 8-12 minggu. Berat badan sekitar 20-25 gram dan tidak tampak cacat secara anatomis. Mencit Balb/c mengalami masa adaptasi dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar dan minum 1 minggu secara *ad libitum*. Mencit tersebut lalu dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit yang ditentukan secara acak.<sup>12</sup>

K : Kelompok kontrol, yaitu mencit yang mendapat diet standar saja selama 30 hari dan hanya disonde aquades.

P1 : Mencit mendapat diet standar, diberi ekstrak dari 80 mg RM per hari dengan cara disonde selama 14 hari.

P2 : Mencit mendapat diet standar, diberi ekstrak dari 160 mg RM per hari dengan cara disonde selama 14 hari.

P3 : Mencit mendapat diet standar, diberi ekstrak dari 320 mg RM per hari dengan cara disonde selama 14 hari.

Kemudian mencit diberikan perlakuan sesuai pembagian kelompok diatas. Setelah perlakuan berakhir, semua mencit diterminasi. Makrofag diisolasi dari rongga peritoneum mencit dengan metode Ding dan Lewis (terlampir). Kemudian dilakukan pengukuran produksi NO dari kultur makrofag dengan metode modifikasi Gries dan Ding et al.<sup>13</sup>

Data yang diperoleh dari 4 kelompok sampel diolah dengan program komputer SPSS 13.00 dengan taraf signifikansi  $p < 0.01$  jika terdapat perbedaan yang bermakna.

## HASIL

Kadar Nitrit oksida dari sampel tiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan metode modifikasi Gries.<sup>13</sup> Kemudian hasil reaksinya dibaca pada ELISA reader dan pengukuran tersebut dapat dilihat kadar nitrit oksida pada tabel 1 dan gambar 1.

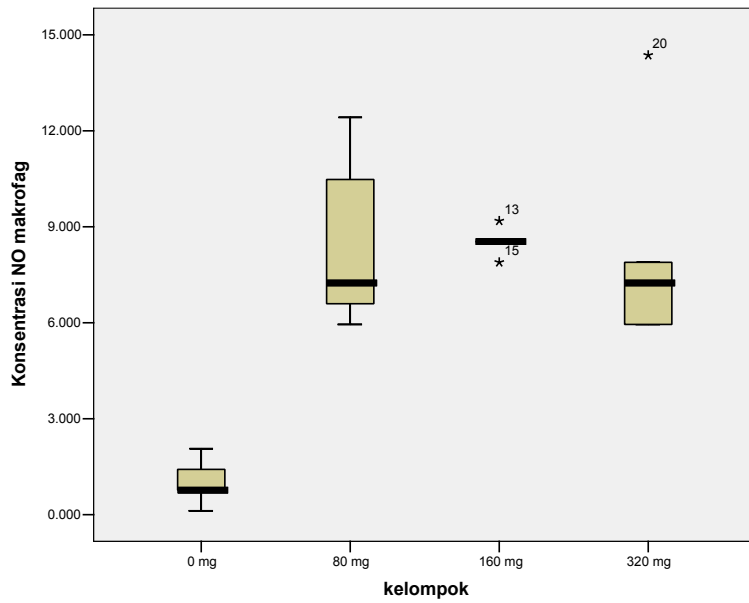
Tabel 1. Kadar nitrit oksida pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ( $\mu\text{M}$ )

No	K	P1	P2	P3
1	0,121	5,948	8,537	5,498
2	1,416	10,479	8,537	7,242
3	0,769	6,595	9,184	5,948
4	2,063	7,242	8,537	7,890
5	0,769	12,421	7,890	14,363
Rerata	1,028	8,531	8,537	8,278

Selanjutnya dilakukan uji normalitas data dengan uji *Saphiro-Wilk*, didapatkan hasil distribusi data tidak normal ( $K=0,814$ ;  $P1=0,335$ ;  $P2=0,325$ ;  $P3= 0,029$ ) sehingga uji berikutnya menggunakan uji statistik non parametrik *Kruskal-wallis* untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna dari kadar nitrit oksida pada seluruh kelompok perlakuan. Kemudian dilakukan uji statistik *Mann-Whitney*.

Hasil uji analisa dengan menggunakan *Kruskal-wallis* untuk perbandingan dua sampel independen didapatkan hasil yang sangat signifikan,  $p= 0,008$  ( $p<0,01$ ). Dari hasil tersebut, menunjukkan perbedaan yang

sangat bermakna pada keempat kelompok.



Gambar 1. Grafik boxplot median kadar nitrit oksida tiap kelompok perlakuan.

Tabel 2. Hasil uji analisa

	K	P1	P2
P1	0,008*		
P2	0,008*	0,690**	
P3	0,008*	0,841**	0,151**

*Mann-whitney*: \* : berbeda sangat bermakna ( $p < 0,01$ )

\*\* : berbeda tidak bermakna ( $p > 0,01$ )

Selanjutnya pada uji *Mann-Whitney*(Tabel 2) dapat dilihat bahwa konsentrasi NO pada kelompok kontrol dibandingkan kelompok perlakuan 1,2,dan 3 terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,008$ ;  $p=0,008$ ;  $p=0,008$ ). Tetapi

jika kelompok perlakuan 1 dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 dan 3 maka mendapatkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p=0,690$ ;  $p=0,841$ ). Demikian halnya, jika kelompok perlakuan 2 dibandingkan dengan kelompok perlakuan 3 maka didapatkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p=0,151$ ).

## PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak RM dosis 80 mg, 160 mg dan 320 mg per hari selama 14 hari akan meningkatkan produksi NO makrofag peritoneal pada mencit Balb/c secara bermakna. Hal ini sesuai dengan teori penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa Kaempferol memiliki kemampuan sebagai imunomodulator.<sup>8</sup>

Kaempferol yang merupakan salah satu zat aktif yang terdapat dalam RM dapat meningkatkan produksi NO makrofag melalui peningkatan sekresi IL-2 yang kemudian merangsang Th1 (T helper) untuk meningkatkan sekresi IFN- $\gamma$ .<sup>2</sup> IFN- $\gamma$  inilah yang potensial menginduksi iNOS yang selanjutnya iNOS akan mengkatalisis L-arginin menjadi sitrulin dengan membebaskan NO.<sup>3,12</sup>

Pada pemberian ekstrak RM dengan dosis 80 mg dan 160 mg per hari selama 14 hari akan menunjukkan peningkatan jumlah produksi NO makrofag tetapi pada pemberian ekstrak RM dengan dosis 320 mg per hari justru menurunkan jumlah produksi NO makrofag walaupun nilainya masih diatas nilai pada kelompok kontrol. Hal ini mungkin karena peningkatan produk NO dapat menekan ekspresi iNOS sehingga dengan pemberian dosis yang semakin tinggi, tidak terus akan membuat produksi NO semakin tinggi karena mekanisme "*enzym inhibition by product*".<sup>14</sup> Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa dosis efektif ditunjukkan pada pemberian ekstrak RM dosis 80 mg dan 160 mg per hari sedangkan pemberian ekstrak RM dosis 320 mg per hari menjadi dosis yang kurang efektif dibandingkan dengan dosis 80 mg dan 160 mg per hari.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Produksi NO makrofag peritoneal mencit Balb/c yang diberi ekstrak Rumput Mutiara dosis bertingkat selama 14 hari menunjukkan peningkatan yang berbeda dengan sangat bermakna dibanding kontrol.

### B.SARAN



1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh Rumput mutiara terhadap produksi NO makrofag dengan sampel yang diinfeksi bakteri.
2. Perlu dilakukan penelitian yang sama dengan menggunakan dosis bertingkat berdasarkan log dosis.
3. Penelitian lebih lanjut dengan bahan Rumput mutiara dengan melakukan standarisasi bahan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa atas penyertaan-NYA selama ini
2. dr. Ratna Damma P, M.Kes atas bimbingan, waktu dan perhatiannya sehingga penulis dapat menyelesaikan artikel ini.
3. dr. Neni Susilaningih, Msi atas bimbingannya dalam pengukuran data.
4. Drs. Gunardi, Apt atas bimbingannya dalam pembuatan ekstraksi dan kromatografi.
5. Seluruh staf laboratorium Kimia Kedokteran, Bioteknologi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah sangat membantu dalam pelaksanaan penelitian.
6. Teman-teman satu kelompok penelitian (Andreis Kia T, Septi D M, Maria C A, Rizki Azenda) atas kerjasama yang mengesankan dan dukungannya selama ini.
7. Bapak Dukut dari bagian Biokimia, Boy Sumantomo, Andhika Gunadharma, Lia Angelin W, David, Maria ayu, Rohaida atas kerjasama dan bantuannya.
8. Keluarga penulis yang telah memberikan kepercayaan dan dukungan baik materiil maupun spirituil hingga selesainya karya tulis ilmiah.
9. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan karya tulis ilmiah ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawijaya KG. *Imunologi Dasar*. Ed.5. Jakarta: Gaya baru, 2002.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. Ed.5. Philadelphia: WB Saunders Company, 2005.
3. Johan A. Synthesis and regulation of nitric oxide. *Jurnal Media Medika Muda* Juli-Desember 2005;1:1-5.
4. K Wallace, Naughton M, Lowe SS, Cushing K. Role of nitric oxide in inflammation-induced suppression of secretion in mouse model of acute colitis [cited Desember 18, 2005]. Available from URL: <http://www.AJPGastrointestinalandliverphysiology.htm>.
5. J Shawn, Turpin JA, Nacy CA. Cytotoxic effector activities of macrophages. In: Rich RR, Fleisher AT, Schwartz BD, Shearer WT, editors. *Clinical immunology principles and practice*. Missouri: Mosby-Year book Inc, 1996:290-97.
6. Fritsche G, Dlaska M, Barton H, Theerl I, Gerimsah K, Weiss G. Nramp1 functionality increases inducible nitric oxide synthase transcription via stimulation of IFN regulatory factor 1 expression [cited September 23, 2005]. Available from URL: <http://www.ThejournalImmunology.htm>.
7. Asai K, Moriwaki S, Maeda M. Kaempferol a tea flavanol, effect on interleukin-2 signal transduction of human T cell leukemia [cited October 14, 2005]. available from URL: <http://www.jircas.affrc.go.jp>.
8. Dharmananda S. Oldelandia and scutellaria [cited August 23, 2005]. Available from URL: <http://www.itmonline.org/arts/oldelandia.htm>.
9. Hsu HY. Tumor inhibition by several component extracted from *Hedyotis corymbosa* and *Hedyotis diffusa* [cited August 23, 2005]. Available from URL: <http://www.cancerprev.org/journal/issues/22/101/28/2864>
10. Rumput mutiara mengaktifkan sirkulasi darah [cited August 23, 2005]. Available from URL: <http://www.republika.com>.
11. Hsu HY. Involvement of p-151NK4b gene expression in oleanic acid and ursolic acid induced apoptosis of hepG2 cells [cited October 10, 2005]. Available from URL: <http://www.cancerprev.org/journal/issues/215>.
12. WHO. Research guideline for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. Manila: WHO Regional Office For western pasific, 1993.
13. Burleson GR, Dean JH, Munson AE. *Methods in immunotoxicology*. 2<sup>nd</sup> volume. New York: Wiley liss

Inc,1995.

14. Chang K, Lee SJ, Cheong I, Billiar TR, Chung HT, Han JA, et al. Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of kappa B. *Exp Mol Med* 2004,36(4):311-24.

Lampiran 1

**JADWAL PELAKSANAAN PENELITIAN**

URAIAN KEGIATAN PENELITIAN	BULAN KE			
	1	2	3	4
Persiapan	***			
Pelaksanaan : <ul style="list-style-type: none"><li>• Adaptasi</li><li>• Perlakuan</li><li>• Pengambilan dan isolasi makrofag</li><li>• Pemeriksaan kadar NO makrofag</li><li>• Pengolahan data dan analisa data</li></ul>	*	** *	*	
Pembuatan laporan			****	****

## Lampiran 6

### **DOSIS KONVERSI EKSTRAK RUMPUT MUTIARA**

Konversi dosis pada manusia yang berat badannya 70 kg ke mencit yang berat badannya 20 gram adalah 0,0026

Besarnya dosis Rumput mutiara ditentukan berdasarkan dosis yang dianjurkan pada manusia adalah 15-60 gram.

8

Perhitungan

Rumput mutiara dosis 30 gram = 30.000 mg

Faktor konversi = 0,0026

Dosis Rumput mutiara untuk mencit 20 gram adalah :

$$= 0,0026 \times 30.000 \text{ mg}$$

$$= 78 \text{ mg}/20 \text{ gram BB}$$

$$= 80 \text{ mg}/20 \text{ gram BB}$$

Rumput mutiara disiapkan dalam 3 besaran dosis kelipatan 2 untuk tiap kelompok, sehingga :

Kelompok perlakuan 1(P1) diberi dosis = 80 mg/20 gram BB

Kelompok perlakuan 2(P2) diberi dosis = 160 mg/20 gram BB

Kelompok perlakuan 3(P3) diberi dosis = 320 mg/20 gram BB

Dosis yang diberikan kepada kelompok perlakuan akan diencerkan 1 ml sesuai dengan kapasitas lambung mencit.

## Lampiran 3

### **PROSEDUR ISOLASI MAKROFAG MENCIT**

**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 pentobarbitol, 50 mg/ml
2. Ethanol 70% (v/v)
3. Asam asetat 3% (v/v) + crystal violet 1 mg/100 ml
4. Roswell Park Memorial Institute ( RPMI )-1640 (GIBCO)
5. Fetal Bovine Serum (FBS)
6. Glutamin (GIBCO)
7. Penicillin-Streptomycin (GIBCO)

**Prosedur :**

Prosedur di bawah ini dilakukan mendapatkan  $5 \times 10^5$  sel/ml. Mencit dimatikan dengan dislokasi serviks. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit perut terbuka dan selubung peritoneumnya dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian diinjeksikan 10 cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum.

Peritoneum dipijat pelan untuk mendapatkan makrofag yang cukup banyak. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan dalam tabung falcon 15 cc. Cairan kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah sel dicuci dengan PBS sampai bersih.

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium RPMI komplet yang terdiri dari RPMI 1640, FBS (Fetal Bovine Serum) 10% ditambah penicilin pada pelet yang didapat. Sel – sel dihitung dengan hemositometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisiskan sel darah merah, kemudian diresuspensikan lagi dengan medium komplet di dalam *microplet 24 well* yang dibawahnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (coverslip), setiap sumuran 200µl (kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/ml), kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplet 1 ml tiap sumuran dan diinkubasikan lagi selama 2 jam, setelah itu sel dicuci RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplet 1 ml tiap

sumuran dan diinkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

#### Lampiran 4

### **PROSEDUR PEMERIKSAAN PRODUKSI NITRIT OKSIDA (NO) MENCIT**

#### **Bahan :**

1. 3-N (1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED)
2. Sulfanilamide
3. Nitrit standar ( $\text{NaNO}_2$ )
4. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (GIBCO)
5. Fetal Bovine Serum (FBS)
6. Lipopolysaccharide (LPS)
7. Penicilline-Streptomysin (GIBCO)
8. Microplate 24 atau 96 well
9. Yellow dan blue tip

#### **Prosedur :**

1. Melakukan prosedur isolasi makrofag
2. Buat suspensi makrofag dalam RPMI + FBS 5% yang mengandung 100  $\mu\text{g}$  Penicillin-Streptomycin hingga didapat  $5 \times 10^5$  sel/ml
3. Letakkan suspensi sel pada 24 atau 96 sumuran corning, 1 atau 0,1 ml/sumuran.
4. Inkubasikan selama 2-3 jam dalam 5%  $\text{CO}_2$  dan suhu  $37^\circ\text{C}$
5. Kultur sel untuk 24 jam berikutnya
6. Ukurlah akumulasi nitrit pada supernatan kultur
7. Gunakan 96 well microplate ELISA dengan dasar rata/flat. Masukkan 100  $\mu\text{l}$  supernatan Reagen Griess (

- reagen chromogenic ) dalam setiap well
8. Pipet 100  $\mu$ l supernatan yang hendak dites atau standar NaNO dalam plate dengan duplikasi atau triplikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blanko
  9. Tunggu selama 5 menit pada ruang untuk pembentukan chromophore dan stabilisasi
  10. Ukur absorbansi pada 550 nm menggunakan automatic microplate reader (misalnya Biotek model EL312)
  11. Buat kurva standar menggunakan analisa regresi linear sederhana/ simpel dari pembacaan standar NaNO dan hitung konsentrasi sampel berdasarkan kurva standar atau sumur regresi

Lampiran 5

**Tabel Kadar Nitrit Oksida Tiap Kelompok (dalam  $\mu$ M)**

Sampel	Kelompok			
	K	P1	P2	P3
1	0,121	5,948	8,537	5,498
2	1,416	10,479	8,537	7,242
3	0,769	6,595	9,184	5,498
4	2,063	7,242	8,537	7,890
5	0,769	12,421	7,890	14,363

## Lampiran 5

### Case Processing Summary

K	0	2	100	0	0%	2	100
1	8	2	100	0	0%	2	100
	1	2	100	0	0%	2	100
	3	2	100	0	0%	2	100



Descriptives

K  
L

0	8	1	3
L 0 11	L 0 11	L 0 11	L 0 11
2 L V 2 L L F 11 2 K L 0 11	2 L V 2 L L F 11 2 K L 0 11	2 L V 2 L L F 11 2 K L 0 11	2 L V 2 L L F 11 2 K L 0 11
1.0 111 1.0 787. 242. 73 121. 503 1042 1522 402	1.0 111 1.0 787. 242. 73 121. 503 1042 1522 402	1.0 111 1.0 787. 242. 73 121. 503 1042 1522 402	1.0 111 1.0 787. 242. 73 121. 503 1042 1522 402
33.	33.	33.	33.
5000.000	5000.000	5000.000	5000.000
1.	1.	1.	1.
8.4 7.5 7.23 2. 2048 154 6440 2120 724	8.4 7.5 7.23 2. 2048 154 6440 2120 724	8.4 7.5 7.23 2. 2048 154 6440 2120 724	8.4 7.5 7.23 2. 2048 154 6440 2120 724
310. 5000.000	310. 5000.000	310. 5000.000	310. 5000.000
52.	52.	52.	52.
8.8 8.8 510. 42. 700 0184 1222 047	8.8 8.8 510. 42. 700 0184 1222 047	8.8 8.8 510. 42. 700 0184 1222 047	8.8 8.8 510. 42. 700 0184 1222 047
310. 5000.000	310. 5000.000	310. 5000.000	310. 5000.000
1.	1.	1.	1.
11 0.8 7.5 155. 3. 2048 143 8410 2120 1222 K	11 0.8 7.5 155. 3. 2048 143 8410 2120 1222 K	11 0.8 7.5 155. 3. 2048 143 8410 2120 1222 K	11 0.8 7.5 155. 3. 2048 143 8410 2120 1222 K
382. 5000.000	382. 5000.000	382. 5000.000	382. 5000.000

**Tests of Normality**

K V	0	.537	2	.500	.061	2	8.14
	8	.526	2	.500	.882	2	.332
	1	.300	2	.161	.883	2	.322
	3	.344	2	.023	.148	2	.029

## NPar Tests

### Kruskal-Wallis Test

	Rank	Sum of Ranks	Mean Rank	N
K	0	3.00	3.00	1
L	8	12.70	1.59	8
T	1	14.90	14.90	1
	3	11.40	3.80	3
Total		20		13

### Test Statistic

C	11.702
b	3
A	.008

### Mann-Whitney Test

	Rank	Sum of Ranks	Mean Rank	N
K	0	3.00	3.00	1
L	8	12.70	1.59	8
T	1	14.90	14.90	1

### Test Statistic

V	.000
V	12.000
Z	-.519
A	.000
E	.008
S	

### Mann-Whitney Test

Ranks

K	0	5	3.00	15.00
L	1	5	8.00	40.00
	T	10		

Test Statistic

N	.000
V	15.000
Z	-2.622
A	.008
E	.008
S	

### Mann-Whitney Test

Ranks

K	0	5	3.00	15.00
L	3	5	8.00	40.00
	T	10		

Test Statistic

N	.000
V	15.000
Z	-2.622
A	.008
E	.008
S	

### Mann-Whitney Test

Ranks

K	8	5	5.00	25.00
L	1	5	8.00	30.00
	T	10		

### Test Statist

N	10.000
V	25.000
Z	-.229
A	.297
E	.699
S	

### Mann-Whitney Test

		Rank		
K	8	2	2.70	28.80
V	3	2	2.30	26.80
	T	10		

### Test Statist

N	11.200
V	26.200
Z	-.212
A	.832
E	.841
S	

### Mann-Whitney Test

		Rank		
K	1	2	6.90	34.20
V	3	2	4.10	20.20
	T	10		

## Test Statist

$\mu$	2.200
$\sigma$	20.200
$\Sigma$	-1.490
$A$	.139
$E$	.151
$S$	