



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Hedyotis corymbosa* TERHADAP  
PRODUKSI ROI MAKROFAG MENCIT *Balb/c* YANG DIINFEKSI  
*Salmonella typhimurium***

**ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH**

**Diajukan untuk :**

**Memenuhi tugas dan melengkapi persyaratan dalam menempuh  
Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran**

**Disusun oleh :**

**Windy Rizkiana**

**NIM : G2A002178**

---

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG**

**2006**

***Hedyotis corymbosa* Extract on ROI Production of  
*Balb/c* mice infected with *Salmonella typhimurium***

**The Effect of**

## Abstract

**Background:** Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) is a kind of plants which is commonly used as a traditional medicine and contains *asperulosid*, *flavonoid*, *ursolic acid*, *oleanic acid*, and *triterpene acid* which functions as *anti microbial* and *anti inflammation*. *Tifoid fever* is caused by *Salmonella typhimurium*. This study is aimed to observe the effect of *Hedyotis corymbosa* on ROI (*Reactive Oxygen Intermediate*) production during the *macrophage phagocytic activity* in *Balb/c mice* infected with *Sallmonella typhimurium*.

**Methods:** An experimental study with *The Post Test Only Control Group Design* was carried out on sample, consisted of 30 *Balb/c* mices, devided into 6 groups, K1 was control group which was only given a standard diet, K2 was a group which infected by *Salmonella typhimurium* on the 10<sup>th</sup> day, K3 was given 80 mg *Hedyotis corymbosa* on the 1<sup>st</sup> day until the 14<sup>th</sup> day without infected with *Sallmonella typhimurium*. P1, P2, P3 were given *Hedyotis corymbosa* 24 mg, 80 mg, 240 mg each group on the 1<sup>st</sup> day until the 14<sup>th</sup> day and also infected by *Salmonella typhimurium* on the 10<sup>th</sup> day. Then observed the ROI production with *NBT (Nitroblue Tetrazolium) methode*.

**Result:** According to the results of the *One Way Analysis of Variance Test (ANOVA)* there was no significant difference between the experiment group treated with *Hedyotis corymbosa* and the control group ( $p > 0,05$ ).

**Conclusion:** *Hedyotis corymbosa* has no role to improve ROI (*Reactive Oxygen Intermediate*) *macrophage*.

**Keywords:** *Reactive Oxygen Intermediate (ROI)*, *Hedyotis corymbosa*, *Salmonella typhimurium*

- 1) Student of Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang
- 2) Histological Lecturer of Medical Faculty, Diponegoro University Semarang

## Pengaruh Pemberian Ekstrak *Hedyotis corymbosa* Terhadap Produksi ROI Makrofag Mencit *Balb/c* yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*

Windy Rizkiana<sup>1</sup>, Neni Susilaningsih<sup>2</sup>

## Abstrak

**Latar Belakang:** Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) merupakan jenis tumbuhan yang dikenal sebagai obat tradisional dan mengandung *asperulosid*, *flavonoid*, dan asam *ursolic*, asam *oleanic* dan asam *triterpene* yang antara lain berfungsi sebagai anti mikroba dan anti inflamasi. Infeksi *Salmonella typhimurium* dapat menyebabkan demam tifoid. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh *Hedyotis corymbosa* dalam produksi ROI selama aktivitas fagositosis makrofag mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

**Metode:** Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan *The Post Test Only Control Group Design*. Sampel adalah 30 ekor mencit *Balb/c* yang dibagi menjadi 6 kelompok, K1 merupakan kelompok yang mendapat perlakuan standar, sedangkan K2 hanya diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada hari ke-10, K3 adalah

kelompok yang hanya mendapat *Hedyotis corymbosa* sebanyak 80 mg pada hari pertama sampai hari ke-14, sedangkan P1, P2, P3 adalah kelompok perlakuan yang mendapat *Hedyotis corymbosa* masing-masing 24 mg, 80 mg, dan 240 mg mulai hari pertama hingga hari ke-14 dan masing-masing kelompok diinfeksi *Salmonella typhimurium* pada hari ke-10. Kemudian dihitung produksi ROI (*Reactive Oxygen Intermediate*) makrofag dengan metode *NBT* (*Nitroblue Tetrazolium*).

**Hasil:** Dari hasil uji *One Way Analysis of Variants (ANOVA)* tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari produksi ROI makrofag mencit *Balb/c* yang diberi *Hedyotis corymbosa* jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ).

**Kesimpulan:** *Hedyotis corymbosa* tidak berperan dalam meningkatkan produksi ROI makrofag.

**Kata Kunci:** *Reactive Oxygen Intermediate (ROI)*, *Hedyotis corymbosa*, *Salmonella typhimurium*

- 1) Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro Semarang.
- 2) Staf Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro Semarang.

## HALAMAN PENGESAHAN

### ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

#### PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Hedyotis corymbosa* TERHADAP PRODUKSI ROI MAKROFAG MENCIT BALB/C TANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium*

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Windy Rizkiana  
G2A002178

Telah diuji dan dipertahankan dihadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 27 Juli 2006 dan telah diperbaiki sesuai saran-saran yang diberikan.

Tim Penguji KTI FK UNDIP Semarang

Ketua Penguji,

Penguji,

dr.Helmia Farida, MKes, SpA  
NIP. 131 296 274

dr.Andrew Johan, Msi  
NIP. 131 673 427

Pembimbing

Dr. Neni Susilaningsih, Msi  
NIP. 131 832 243

## PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan penyakit demam sistemik akut yang disebabkan oleh *Salmonella typhi*. Di Indonesia demam tifoid merupakan penyakit endemis dan ditemukan sepanjang tahun dengan insiden tertinggi terjadi pada anak dan transmisi tersering melalui air yang tercemar serta makanan, penyebaran penyakit ini sangat bergantung pada kualitas hygiene dan sanitasi lingkungan.<sup>1</sup>

*Salmonella typhi* merupakan hospes yang spesifik dan bersifat patogen terhadap manusia, sedangkan *Salmonella typhimurium* bersifat patogen terhadap tikus, dan memberikan kelainan atau patogenitas yang serupa dengan demam tifoid pada manusia, oleh karena itu *Salmonella typhimurium* dapat digunakan sebagai model untuk penelitian eksperimental demam tifoid pada mencit.<sup>2</sup>

*Salmonella* adalah bakteri intraseluler, sehingga sistem imun seluler berperan penting dalam pertahanan tubuh terhadap penyakit ini. Fagosit baik mononuklear maupun polimorfonuklear berperan dalam menghambat replikasi bakteri. Sel-sel imunokompeten dapat membunuh mikroba dengan dua cara yaitu fagositosis bakteri intraseluler oleh makrofag dan lisis sel yang terinfeksi oleh limfosit T dan sel NK (Natural Killer). Dalam proses fagositosis terdapat tiga fase yaitu fase pengenalan, degranulasi, dan pembunuhan atau *killing*.<sup>3</sup>

ROI (*Reactive Oxygen Intermediate*) terdiri atas radikal peroksida, radikal hidroksil dan singlet oksigen, ROI sangat reactive dalam proses membunuh bakteri,<sup>4</sup> prosesnya sendiri terjadi beberapa saat setelah fagositosis dan dikenal sebagai *respiratory burst* (percepatan respirasi) yang terjadi karena stimulasi jalur

metabolik.<sup>5</sup>

*Respiratory burst* dimulai dengan adanya perubahan  $O_2$  menjadi  $O_2^-$  dengan bantuan enzim NADPH oksidase, kemudian dalam reaksi yang dikatalisis oleh Superoksida Dismutase (SOD), dua molekul yaitu masing-masing  $H^+$  dan  $O^-$  dan membentuk  $H_2O_2$ , sedangkan di netrofil  $H_2O_2$  tersebut akan dikonversi membentuk molekul bakterisidal oleh enzim Mieloperoksidase (MPO). Dengan adanya  $Fe^{2+}$  maka  $O_2^-$  dan  $H_2O_2$  akan bereaksi membentuk OH dan  $*O_2$  (singlet oksigen) yang sangat reaktif sebagai bakterisid. Dikatakan bahwa molekul-molekul diatas khususnya  $H_2O_2$  berperan sangat penting dalam *bacterial killing* oleh makrofag terhadap *Salmonella* karena bersifat bakterisid.<sup>6</sup>

*Hedyotis corymbosa* atau lebih dikenal dengan nama rumput mutiara merupakan kelompok familia *Rubiaceae*, senyawa yang terkandung di dalamnya antara lain asperulosid, flavonoid, asam ursolic, asam oleanic dan asam triterpene, yang berkhasiat sebagai anti mikroba, anti inflamasi, hepatoprotective, anti oxidan dan anti kanker.<sup>7,8,9</sup> Pada konsentrasi yang relatif besar dapat pula berefek pada penghambatan pertumbuhan *Salmonella typhi*.<sup>10</sup>

Pengaruh pemberian ekstrak *Hedyotis corymbosa* terhadap peningkatan sistem imun tubuh belum diketahui secara jelas.<sup>11</sup> Makrofag yang teraktivasi dalam proses *killing* ditandai dengan peningkatan kemampuan fagositosis dan produksi ROI sehingga penelitian ini bertujuan untuk membandingkan produksi ROI makrofag pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* dengan kelompok kontrol.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di laboratorium Histologi dan Bioteknologi FK UNDIP Semarang. Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan *The Post Test Only Control Group Design*. Sampel penelitian terdiri atas 30 ekor mencit yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) UGM Yogyakarta, dengan kriteria inklusi yaitu

mencit Balb/c jantan, umur 8-10 minggu, berat badan 20-25 gram, dan tidak ada cacat secara anatomis, sedangkan kriteria eksklusinya adalah mencit yang mati. Besar sampel penelitian ini berdasarkan *Research Guidelines For Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicine*, yaitu tiap kelompok perlakuan minimal 5 mencit.<sup>12</sup> Sebelum diadakan perlakuan, mencit diadaptasikan selama 1 minggu kemudian dibagi menjadi 6 kelompok.

Ke enam kelompok perlakuan tersebut adalah :

Kontrol 1 (K1) : Diberi perlakuan standar.

Kontrol 2 (K2) : Diberi *Salmonella typhimurium* pada hari ke-10 dengan titer  $10^3$ .

Kontrol 3 (K3) : Diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* 80mg/ sonde / hari, pada hari ke-1 sampai hari ke-14 perlakuan.

Perlakuan 1 (P1) : Diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* 24mg/ sonde / hari, pada hari ke-1 sampai hari ke-14, dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan titer  $10^3$  pada hari ke-10.

Perlakuan 2 (P2) : Diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* 80mg/ sonde / hari, pada hari ke-1 sampai hari ke-14, dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan titer  $10^3$  pada hari ke-10.

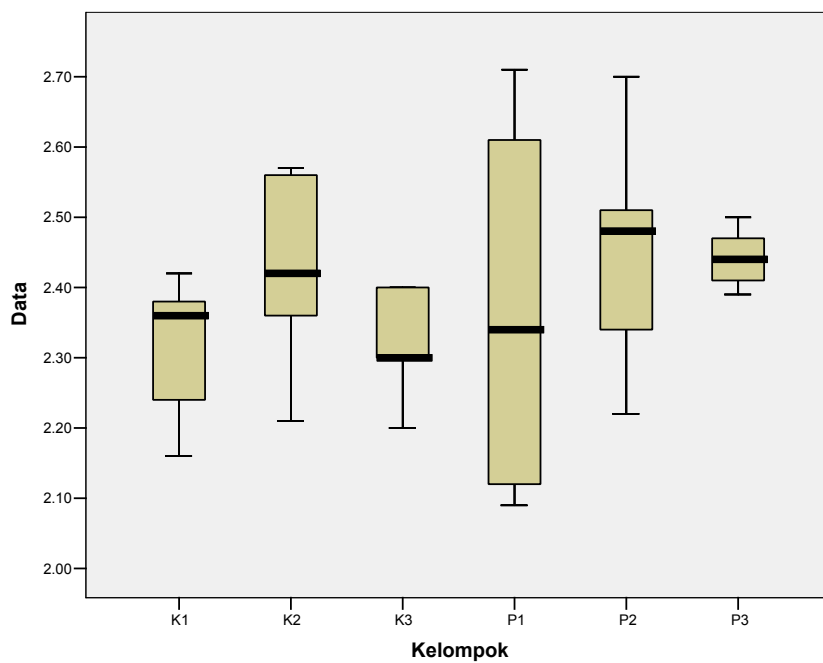
Perlakuan 3 (P3) : Diberi ekstrak *Hedyotis corymbosa* 240mg/sonde/hari, pada hari ke-1 sampai hari ke-14, dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan titer  $10^3$  pada hari ke-10.

Pada hari ke-15 dilakukan *killing* mencit di Laboraturium Bioteknologi. Masing-masing mencit dilakukan isolasi makrofag dari rongga peritoneumnya, dilanjutkan dengan pemeriksaan ROI dengan metode *Nitroblue Tetrazolium (NBT) reduction assay* menurut *Leih et al* (1986). Data jumlah produksi ROI ditentukan berdasarkan prosentase terbentuknya presipitat pada sel makrofag dinyatakan dalam derajat 1 – 4 kemudian dilakukan perhitungan dan dibuat rata-rata dalam 200 sel makrofag.

Data dianalisis secara deskriptif untuk menghitung rerata dan simpang baku produksi ROI dengan menggunakan program komputer SPSS 13 *for windows*, kemudian diuji normalitasnya dengan *Saphiro Wilk*.

Karena distribusi data yang didapatkan normal, maka dilanjutkan dengan *One way Analysis of Varians Test (ANOVA)*.

## HASIL



**Gambar 1. Grafik *Box plot* Jumlah Produksi ROI Makrofag.**

**Tabel 1. Rerata Produksi ROI Makrofag**

	Rerata	Simpang Baku
K1	2,31	0,10
K2	2,42	0,14
K3	2,32	0,08
P1	2,37	0,28
P2	2,45	0,18
P3	2,44	0.04

Pada grafik 1 dapat dilihat sebaran data median produksi ROI makrofag. Median produksi ROI tertinggi adalah kelompok perlakuan dua (P2) dan yang terendah pada kelompok kontrol tiga (K3). Pada table 1 dapat diketahui rerata dan simpang baku produksi ROI tertinggi adalah kelompok perlakuan dua (P2) yaitu sebesar  $(2,45 \pm 0,18)$  dan yang terendah adalah kelompok kontrol pertama (K1) sebesar  $(2,31 \pm 0,10)$ . Hasil uji *One Way Analysis of Variant Tests (ANOVA)* didapatkan hasil  $p=0,613$  (signifikan jika  $p < 0,05$ ) artinya tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil perhitungan produksi ROI makrofag antara kelompok kontrol (K1, K2, K3) dengan kelompok perlakuan (P1, P2, P3).

## PEMBAHASAN

*Hedyotis corymbosa* atau rumput mutiara dikenal masyarakat Indonesia sebagai obat penurun panas dan anti radang.<sup>10</sup> Tanaman ini mengandung senyawa asperulosid, asam ursolic, asam oleanic, dan asam triterpene.<sup>7,8,10</sup> selain itu kandungan flavonoid dalam *Hedyotis corymbosa* dapat meningkatkan sistem imunitas tubuh yaitu sebagai imunomodulator.<sup>9,13</sup>

Rerata jumlah produksi ROI makrofag diuji dengan *One Way Analysis of Variants test (ANOVA)* dan didapatkan hasil yang tidak bermakna ( $p=0,613$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Hedyotis corymbosa* tidak meningkatkan produksi ROI makrofag.



Fagositosis bukan merupakan satu-satunya aktivitas makrofag dalam sistem imun terhadap bakteri intraseluler, dan fagositosis juga bukan satu-satunya cara mengeliminasi bakteri intraseluler. Fungsi makrofag selain memfagositosis partikel asing juga sebagai sel penyaji dan memproduksi sejumlah sitokin.<sup>14</sup> Sehingga mungkin efek immunomodulasi dari *Hedyotis corymbosa* dalam mengaktivasi makrofag tidak pada aktivitas fagositosisnya, sehingga ROI sebagai bahan aktif yang dihasilkan makrofag pada akhir proses fagositosis juga tidak menunjukkan perubahan yang bermakna.

Selain itu dalam penelitian ini terdapat beberapa hal yang dapat mempengaruhi hasil penelitian salah satunya yaitu dosis *Hedyotis corymbosa* yang digunakan masih merupakan dosis yang dipakai masyarakat sehari-hari, dikarenakan dosis efektif *Hedyotis corymbosa* belum ditemukan.

Dalam grafik *Box Plot* terlihat bahwa nilai median kelompok K1 yang diberi perlakuan standar lebih tinggi dibandingkan kelompok K3 yang diberi 80 mg *Hedyotis corymbosa* tanpa infeksi *Salmonella typhimurium*, hal ini dimungkinkan terjadi karena :

1. Subjektivitas peneliti, berupa kesalahan dalam pembuatan dan pembacaan preparat.
2. Fungsi ROI sangat dominan dalam aktivitas membunuh bakteri, sedangkan pada kelompok K1 dan K3 tidak diberi *Salmonella typhimurium*, sehingga efek dari produksi ROI dalam aktivitas membunuh bakteri tidak tampak secara jelas.
3. *Hedyotis corymbosa* mengandung flavonoid yang dalam konsentrasi tertentu dapat bersifat sebagai immunomodulator atau immunosuppresant terhadap produksi ROI. Dalam dalam penelitian ini dimungkinkan fungsi flavonoid pada K3 lebih bersifat sebagai immunosupresant sehingga menekan produksi ROI.
4. *Hedyotis corymbosa* mengandung berbagai zat selain flavonoid, dan interaksi antar berbagai zat tersebut dimungkinkan dapat menghambat produksi ROI, hal ini terbukti pada kelompok K3 yang diberi *Hedyotis corymbosa* 80 mg terjadi penurunan produksi ROI dibanding K1 yang hanya mendapat perlakuan standar.
5. Penelitian terhadap berapa lama timbul nya efek immunostimulan atau immusuppresant dari flavonoid yang terkandung dalam *Hedyotis corymbosa* belum pernah dilakukan, sehingga dimungkinkan waktu 14 hari pada

perlakuan terhadap kelompok K3 belum cukup untuk mamacu efek immunostimulan dari flavonoid yang terkandung dalam *Hedyotis corymbosa*.

## **KESIMPULAN**

Pemberian ekstrak *Hedyotis corymbosa* tidak menyebabkan peningkatan yang bermakna terhadap produksi ROI makrofag dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## **SARAN**

1. Dapat dilakukan penelitian untuk menentukan dosis efektif *Hedyotis corymbosa*.
2. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian ekstrak *Hedyotis corymbosa* dalam interval waktu dan dosis yang berbeda, sehingga dapat mencapai dosis optimal dan efek yang adekuat terhadap peningkatan produksi ROI makrofag secara bermakna.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek pemberian ekstrak *Hedyotis corymbosa* yang di kombinasikan dengan tumbuhan herba lainya atau dengan kloramfenikol sebagai obat demam tifoid.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan syukur kepada Allah SWT atas Berkat dan Rahmat Nya, serta ucapan terima kasih kepada dr. Neni Susilaningsih, M.Si selaku dosen pembimbing atas waktu dan bimbingannya, dr.Edi Dharmana, M.Sc, Ph.D, SP.ParK selaku Reviewer proposal, staf laboratorium Bioteknologi dan Histologi FK UNDIP, serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian Artikel Karya Tulis Ilmiah ini.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. Mansjoer A, Triyanti K, Savitri R, Ika W, Setiowulan W. Kapita Selekta Kedokteran: Demam Tifoid. Edisi III. Jakarta: Media Aesculapius, 1999 ; 421 – 25 .
2. Gao XM, Tite JP, Lipscombe M jones SR, Ferguson DJP, Mc Michael AJ. Recombinant Salmonella typhimurium Strain That Invade Non Phagocytic Cells Are Resistant to Recognition by Antigen Specific Cytotoxic T Lymphocytes. Infect Immun, 1992; 60(9):3780-9.
3. Abbas AK, Lichman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 2<sup>nd</sup> Edition. Philadelphia : WB Saunders Company, 1994.
4. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 6<sup>th</sup> edition. London-New York Gower Medical Publishing,1997.

5. Bellanti JA, Kadlec JV. Immunobiologi umum. In: Bellanti JA, Wahab AS, editors. Immunology III. 3<sup>th</sup> edition. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 1993.
6. Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial Action of The NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis 1. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages In Vitro. J. Exp Med 2000; 192(2): 227-36
7. Sudarsono. *Asperulosid*, senyawa *iridoid* dalam *Hedyotis corymbosa*. Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta. (Accesed on September 2005)  
Available at [http:// www.members.tripod.com/~ugm2/mFi103.htm](http://www.members.tripod.com/~ugm2/mFi103.htm)
8. Hsu HY. Involvement of p-15INK4b gene expression in oleanolic acid and ursolic acid induced apoptosis of hep-G2 cells.(Accesed on August 2005)  
Available at [http:// www.cancaprev.org/Journal/Issues/126/101/1092/4315](http://www.cancaprev.org/Journal/Issues/126/101/1092/4315)
9. Fungsi flavonoid sebagai anti oksidan dan peningkatan sistem imun. (Accesed on June 2006)  
Available at <http://www.kompas.com/kompas-cetak/02011/22/ipitek/manf10.htm>
10. Sudarsono. Tumbuhan obat II: Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan. Yogyakarta: Pusat Studi Obat Tradisional UGM, 2002.
11. Tanaman obat Indonesia, Rumput *Hedyotis corymbosa*. (Accesed on September2005)  
Available at [http:// www.ipitek .net.id/ind/cakra \\_obat/tanamanobat.php](http://www.ipitek.net.id/ind/cakra_obat/tanamanobat.php)
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. Tubuh kebal dengan herbal. (Accesed on June 2006)  
Available at <http://www.kompas.com/kesehatan/news/0603/27/092445.htm>

14. Kresno SB. Immunology : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Edisi 4.  
Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 2001.

## LAMPIRAN

### I. Prosedur Isolasi Makrofag Mencit

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi cervik, kemudian di buat irisan kecil pada kulit bagian medial abdomen dengan menggunakan gunting. Robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit sehingga kulit terkelupas dan tampak peritonium, bersihkan dengan alkohol 70%.
2. Kemudian diinjeksi 9-10 cc larutan RPMI dingin.
3. Peritonium dipijat pelan untuk mendapatkan makrofag yang cukup banyak.
4. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan kedalam tabung.
5. Cairan kemudian disentrifuge 800rpm pada suhu 4°C selama 5 menit, bila cairan terkontaminasi darah, sel dicuci dengan PBS sampai bersih.
6. Setelah supernatan dibuang ditambahkan medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10%.
7. Setelah itu kultur sel dalam medium komplit didalam sumuran yang bawahnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (cover slip) dengan kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/ml
8. Kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C selama 300 menit.
9. Lalu sel dicuci 2 kali dengan RPMI dan ditambahkan medium komplit 1ml tiap sumuran dan inkubasi

dilanjutkan sampai 24 jam.

## II. Prosedur Pemeriksaan ROI dengan Cara Reduksi NBT

Prinsip :

Makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresi Anion Superoksid ( $O_2^-$ ) yang akan mengoksidasi NBT menjadi formazan (tidak larut) dengan perwarna Neutral Red tampak butir – butir biru

Cara pemeriksaan :

1. Suspensi makrofag yang telah dihitung dan dikultur pada microplate 12 well yang telah diberi cover slip bulat, setiap sumuran 200  $\mu$ L ( $5 \times 10^5$  sel), diinkubasikan dalam inkubator  $CO_2$  5%  $37^\circ C$  selama 300 menit.
2. Tambahkan medium komplit 1 ml / sumuran diinkubasi selama 2 jam.
3. Sel dicuci dengan RPMI 2 x, kemudian ditambahkan medium komplit 1 ml / sumuran dan diinkubasikan 24 jam.
4. Setelah itu ditambahkan 500  $\mu$ L larutan NBT yang mengandung 125 ng/ $\mu$ L PMA. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja.
5. Inkubasikan dalam inkubator  $CO_2$  5%  $37^\circ C$  selama 60 menit.
6. Sel dicuci dengan PBS 3x lalu dikeringkan pada suhu kamar.
7. Selanjutnya difiksasi dengan methanol absolut selama 2 – 3 menit.
8. Setelah kering warnai dengan Neutral Red Sol selama 15 menit, cuci dengan aquades kemudian keringkan pada suhu kamar.
9. Coverslip dimounting pada kaca objek dengan Canada Balsam atau DPX.

10. Sel dengan reduksi NBT (biru) dihitung persentasinya dari 200 sel dan di scoring dalam derajat 1 – 4.

### III. Perhitungan ROI makrofag

Data diperoleh dengan menghitung prosentase makrofag yang teroksidasi NBT, dan digolongkan dalam derajat 1-4 :

Derajat 1 : Luas presipitat < 25 %

Derajat 2 : Luas presipitat 25 – 50 %

Derajat 3 : Luas presipitat 50 – 75 %

Derajat 4 : Luas presipitat > 75

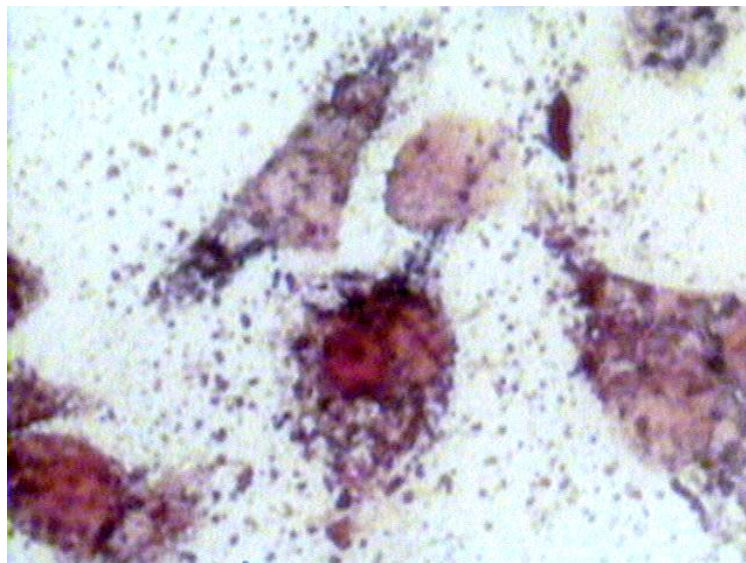
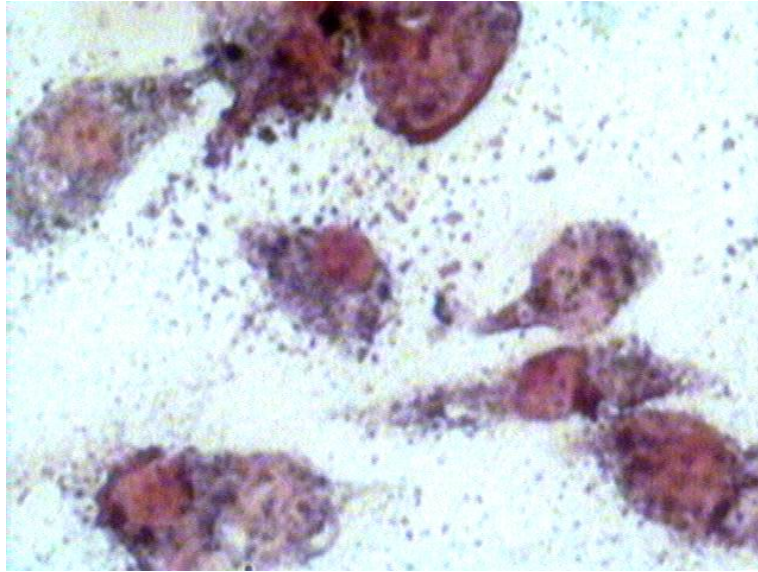
Masing-masing sediaan dibaca pada 200 sel makrofag kemudian dilakukan perhitungan dan dibuat rata-rata :

$$\frac{1 (a) + 2 (b) + 3 (c) + 4 (d)}{200 \text{ sel}}$$

Keterangan:

- 1,2,3,4 adalah derajat luas presipitat makrofag yang teroksidasi NBT
- 200 sel adalah jumlah sel yang di amati
- a = jumlah sel makrofag yang teroksidasi NBT dan digolongkan ke dalam derajat 1 yang mempunyai luas presipitat <25%
- b = jumlah sel makrofag yang teroksidasi NBT dan digolongkan ke dalam derajat 2 yang mempunyai luas presipitat 25-50%
- c = jumlah sel makrofag yang teroksidasi NBT dan digolongkan ke dalam derajat 3 yang mempunyai luas presipitat 50-75%
- d = jumlah sel makrofag yang teroksidasi NBT dan digolongkan ke dalam derajat 4 yang mempunyai luas presipitat >75%

### Foto Produksi ROI makrofag



**Ket : Butir-butir formazan dari NBT yang teroksidasi**

**Explore**

**Kelompok**



Case Processing Summary

□	K	100	0	100.0%	100	100
	K	100	0	100.0%	100	100
	K	100	0	100.0%	100	100
	F	100	0	100.0%	100	100
	F	100	0	100.0%	100	100
	F	100	0	100.0%	100	100

Descriptives

Category	Sub-category	Item	Mean	Std. Deviation	N
C	K	1	5.31	.548	10
		2	5.17	.517	10
		3	5.44	.544	10
		4	5.31	.531	10
		5	5.36	.536	10
		6	5.15	.515	10
	K	7	5.108	.5108	10
		8	5.16	.516	10
		9	5.45	.545	10
		10	5.26	.526	10
		11	5.20	.520	10
		12	5.23	.523	10
K	K	13	5.45	.545	10
		14	5.45	.545	10
		15	5.25	.525	10
		16	5.146	.5146	10
		17	5.21	.521	10
		18	5.27	.527	10
	K	19	5.38	.538	10
		20	5.28	.528	10
		21	5.25	.525	10
		22	5.27	.527	10
		23	5.35	.535	10
		24	5.32	.532	10
F	K	25	5.21	.521	10
		26	5.45	.545	10
		27	5.35	.535	10
		28	5.30	.530	10
		29	5.07	.507	10
		30	5.08	.508	10
	F	31	5.20	.520	10
		32	5.40	.540	10
		33	5.20	.520	10
		34	5.15	.515	10
		35	5.15	.515	10
		36	5.15	.515	10
F	K	37	5.37	.537	10
		38	5.05	.505	10
		39	5.25	.525	10
		40	5.37	.537	10
		41	5.34	.534	10
		42	5.07	.507	10
	F	43	5.28	.528	10
		44	5.09	.509	10
		45	5.21	.521	10
		46	5.25	.525	10
		47	5.25	.525	10
		48	5.25	.525	10
F	K	49	5.45	.545	10
		50	5.00	.500	10
		51	5.00	.500	10
		52	5.00	.500	10
		53	5.00	.500	10
		54	5.00	.500	10
	F	55	5.00	.500	10
		56	5.00	.500	10
		57	5.00	.500	10
		58	5.00	.500	10
		59	5.00	.500	10
		60	5.00	.500	10



Descriptives

Group	Variable	Mean	Std. Deviation	N
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10
K	11	5.75	1.15	10
	12	5.75	1.15	10
	13	5.75	1.15	10
	14	5.75	1.15	10
	15	5.75	1.15	10
	16	5.75	1.15	10
	17	5.75	1.15	10
	18	5.75	1.15	10
	19	5.75	1.15	10
	20	5.75	1.15	10



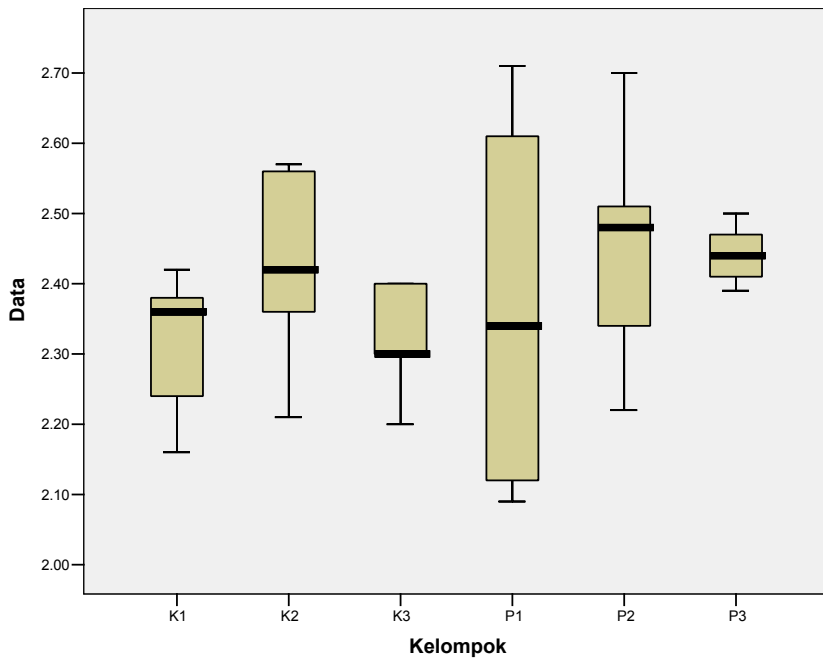
Descriptives

Group	Variable	Mean	Std. Deviation	N
K	Il	5.31	1.08	20
	Il	5.17	1.10	20
	Il	5.44	1.08	20
	Il	5.31	1.10	20
	Il	5.36	1.08	20
	Il	5.15	1.10	20
	Il	5.16	1.08	20
	Il	5.45	1.08	20
	Il	5.28	1.10	20
	Il	5.50	1.08	20
K	Il	5.33	1.08	20
	Il	5.45	1.10	20
	Il	5.31	1.08	20
	Il	5.45	1.10	20
	Il	5.45	1.08	20
	Il	5.50	1.10	20
	Il	5.21	1.08	20
	Il	5.27	1.10	20
	Il	5.36	1.08	20
	Il	5.58	1.10	20
K	Il	5.35	1.08	20
	Il	5.21	1.10	20
	Il	5.51	1.08	20
	Il	5.45	1.10	20
	Il	5.35	1.08	20
	Il	5.30	1.10	20
	Il	5.00	1.08	20
	Il	5.83	1.10	20
	Il	5.50	1.08	20
	Il	5.40	1.10	20
F	Il	5.15	1.08	20
	Il	5.21	1.10	20
	Il	5.15	1.08	20
	Il	5.15	1.10	20
	Il	5.37	1.08	20
	Il	5.05	1.10	20
	Il	5.75	1.08	20
	Il	5.37	1.10	20
	Il	5.34	1.08	20
	Il	5.70	1.10	20
F	Il	5.25	1.08	20
	Il	5.71	1.10	20
	Il	5.09	1.08	20
	Il	5.80	1.10	20
	Il	5.71	1.08	20
	Il	5.05	1.10	20
	Il	5.71	1.08	20
	Il	5.05	1.10	20
	Il	5.25	1.08	20
	Il	5.25	1.10	20
K	Il	5.31	1.08	20
	Il	5.45	1.10	20
	Il	5.25	1.08	20
	Il	5.33	1.10	20
	Il	5.45	1.08	20
	Il	5.25	1.10	20
	Il	5.45	1.08	20
	Il	5.33	1.10	20
	Il	5.45	1.08	20
	Il	5.33	1.10	20

### Tests of Normality

□	K	.571	2	.500	.010	2	.470
	K	.518	2	.500	.022	2	.040
	K	.531	2	.500	.881	2	.314
	F	.517	2	.500	.893	2	.373
	F	.171	2	.500	.082	2	.040
	F	.102	2	.500	.474	2	.898

### Data



## Oneway

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	2	.010	.755	.613
Within Groups	.010	54	.020		
Total	.013	56			

## Means Plots



