



**UJI AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PADA MENCIT C3H YANG
DIBERI TEPUNG TEMPE KEDELAI SEBELUM DIINOKULASI
SEL ADENOCARCINOMA MAMMAE**

SKRIPSI

Oleh:

**Dia Qori Yaswinda
NIM 111810401033**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**UJI AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PADA MENCIT C3H YANG
DIBERI TEPUNG TEMPE KEDELAI SEBELUM DIINOKULASI
SEL ADENOCARCINOMA MAMMAE**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**Dia Qori Yaswinda
NIM 111810401033**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini penulis persembahkan kepada :

1. Orang tua tercinta, Ibunda tercinta Ida dan Ayahanda tercinta Yasin yang telah memberikan kasih sayang, do'a restu dan pengorbanan tiada henti;
2. Adikku tercinta Jihan Nuri Yaswinda yang selalu mendukung dan memberi semangat;
3. Semua guru yang telah mendidik dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, terima kasih yang tak terhingga atas ilmu yang Engkau berikan;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap”

(Surat Alam Nasyrah, 6-8) *)

“.....Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antarmu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan.”

(Surat Al Mujadalah, 11)**)

“Sampaikanlah ilmu dariku (Rasulullah SAW) walau hanya satu ayat.”

(HR Al-Bukhari 3/1275 no 3274)

*) Yayasan Penyelenggara Penerjemah/Penafsir Al Quran. 1971. *Al Quran dan Terjemahan*. Saudi Arabia.

***) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penerjemah / Penafsiran Al Qur'an. 2009. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bogor: Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Dia Qori Yaswinda

NIM : 111810401033

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag pada Mencit C3H yang Diberi Tepung Tempe Kedelai Sebelum Diinokulasi Sel *Adenocarcinoma Mammae*" adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai sepenuhnya oleh Dra. Mahriani, M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 05 Oktober 2015

Yang Menyatakan,

Dia Qori Yaswinda

NIM 111810401033

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PADA MENCIT C3H YANG
DIBERI TEPUNG TEMPE KEDELAI SEBELUM DIINOKULASI
SEL *ADENOCARCINOMA MAMMAE***

Oleh

Dia Qori Yaswinda
NIM 111810401033

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Sri Mumpuni W.W., S.Pd., M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag pada Mencit C3H yang Diberi Tepung Tempe Kedelai Sebelum Diinokulasi Sel *Adenocarcinoma mammae***”, telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Dra. Mahriani, M.Si
NIP 195703151987022001

Sri Mumpuni W.W., S.Pd., M.Si
NIP 197105101999032002

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd
NIP 195805281988021002

Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si
NIP 197306012000032001

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag pada Mencit C3H yang Diberi Tepung Tempe Kedelai Sebelum Diinokulasi Sel *Adenocarcinoma Mammae*; Dia Qori Yaswinda, 111810401033; 2015: 41 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kanker mammae merupakan penyebab kematian kedua pada wanita setelah kanker serviks. Data dari *Pathological Based Registration* pada tahun 2005, menunjukkan bahwa kanker mammae di Indonesia mencapai 20.000 kasus baru per tahun. Pada umumnya, tubuh akan melakukan *immunosurveillance* terhadap sel-sel yang bermutasi untuk mencegah terjadinya kanker mammae, tetapi terkadang terjadi *immunological escape*, yaitu kegagalan sistem imun untuk mendeteksi sel yang bermutasi sehingga dapat berkembang menjadi sel kanker. Hal ini berkaitan erat dengan lemahnya sistem imun.

Sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh yang mampu mengenali dan melawan sel kanker. Sel imun yang berperan untuk melawan sel kanker adalah *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL), sel *natural killer* (NK) dan makrofag. CTL dan sel NK melakukan sitotoksitas dengan mengeluarkan perforin dan protease yang disebut granzim, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis. Makrofag dapat melakukan aktivitas fagositosis setelah mengalami aktivasi oleh Interferon - γ (IFN- γ) dan *Macrophage Activation Factor* (MAF). Adanya IFN- γ dan MAF antara lain dipengaruhi oleh isoflavon di dalam tubuh. Salah satu bahan alami yang mengandung isoflavon dan berpotensi untuk meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag adalah tepung tempe kedelai. Senyawa isoflavon dalam tempe kedelai dapat meningkatkan proliferasi dan maturasi sel T yang akan mensekresikan limfokin berupa IFN- γ dan MAF. Limfokin inilah yang akan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit yang diinokulasi sel kanker

mammae menggunakan pengujian *latex beads*. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental dengan hewan uji berupa mencit betina strain C3H sebanyak 18 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok Kontrol Negatif (mencit kontrol normal), Kontrol Positif (mencit kontrol bertumor), kelompok D1 (0,8 g tepung tempe), D2 (1,6 g tepung tempe), D3 (2,4 g tepung tempe) dan D4 (3,2 g tepung tempe). Parameter pengamatan yang dilakukan adalah jumlah makrofag aktif, jumlah *latex beads* yang difagosit oleh makrofag dan indeks fagositosis makrofag.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kontrol dan perlakuan pada jumlah makrofag aktif, jumlah *latex beads* yang difagosit oleh makrofag dan indeks fagositosis makrofag, sedangkan antar perlakuan tidak berbeda nyata. Peningkatan rata-rata tertinggi terdapat pada dosis 2,4 g dengan jumlah makrofag aktif sebesar 95,33 per 100 sel makrofag, jumlah *latex beads* yang difagosit oleh makrofag sebesar 475,67 per 100 sel makrofag, serta indeks fagositosis makrofag sebesar 4,76.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, karunia serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag pada Mencit C3H yang Diberi Tepung Tempe Kedelai Sebelum Diinokulasi Sel *Adenocarcinoma Mammae*” ini dengan baik.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis banyak menerima bantuan dari berbagai pihak yang bersifat materiil, bimbingan maupun semangat. Oleh karena itu, penulis mengucapkan rasa penghargaan dan terima kasih kepada :

1. Dra. Mahriani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Sri Mumpuni W.W., S.Pd., M.Pd., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang banyak meluangkan waktu, bimbingan serta arahan sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd. dan Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si selaku Dosen Penguji, yang banyak memberikan bimbingan, kritik dan saran bagi penulis hingga selesai penulisan skripsi ini;
3. Dra. Dwi Setyati, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan memberikan motivasi selama penulis menjadi mahasiswa;
4. orang tua, saudara dan keluarga besar yang telah memberikan motivasi dan mendoakan selama penulis mengerjakan skripsi;
5. segenap civitas akademika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu selama masa perkuliahan;
6. teknisi Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Ibu Istini yang banyak membantu serta membina selama penulis bekerja di laboratorium;
7. Alvian Afif Fadhullah atas kebersamaan, doa, dukungan dan semangatnya;
8. sahabat Arlina Mustika Sari, Anis Barokah, Nidaul Hikmah, Nur Putri Rahardiyani, Dita Ayu Faradila, Risa Oktaviana dan Qoyyimah Yuliani atas kebersamaan, dukungan dan bantuannya;

9. Kakak-kakak angkatan Gusti Agung, Chintia Dwi dan Maya Indah yang telah membantu dan memberikan dukungan;
10. teman-teman tercinta angkatan 2011 Jurusan Biologi Universitas Jember yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala bantuan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukan. Aamiin.

Jember, 05 Oktober 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Respon Imun terhadap Kanker Mammae	4
2.2 Peran Makrofag dalam Sistem Imun	5
2.3 Fagositosis Makrofag dan Perannya terhadap Sel Kanker	7
2.4 Kandungan Tempe Kedelai dan Pengaruhnya terhadap Makrofag	9

2.5 Hipotesis.....	11
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	12
3.2 Alat dan Bahan.....	12
3.3 Rancangan Penelitian.....	12
3.4 Prosedur Penelitian.....	13
3.4.1 Pemeliharaan Hewan Uji.....	15
3.4.2 Pembuatan Tepung Tempe Kedelai.....	15
3.4.3 Penentuan Dosis dan Aplikasi.....	15
3.4.4 Pembuatan dan Inokulasi Sel <i>Adenocarcinoma</i> <i>Mammae</i>	16
3.4.5 Isolasi Makrofag.....	16
3.4.6 Pengujian Aktifitas Fagositosis Makrofag.....	17
3.5 Parameter Penelitian.....	18
3.6 Analisis Data.....	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
4.1 Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Makrofag Aktif Mencit C3H.....	19
4.2 Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah <i>Latex</i> <i>Beads</i> yang Difagosit oleh Makrofag Mencit C3H yang Diinokulasi Sel <i>Adenocarcinoma Mammae</i>	22
4.3 Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Indeks Fagositosis Makrofag pada Mencit C3H yang Diinokulasi Sel <i>Adenocarcinoma Mammae</i>	23
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Hasil analisis senyawa isoflavon tepung tempe kedelai	10
4.1 Rata-rata jumlah makrofag aktif dalam 100 sel makrofag mencit C3H	20
4.2 Rata-rata jumlah <i>latex beads</i> yang difagosit oleh 100 sel makrofag mencit C3H	22
4.3 Rata-rata indeks fagositosis makrofag mencit C3H yang diinokulasi sel <i>Adenocarcinoma mammae</i>	24

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Mekanisme APC pada makrofag	8
2.2 Mekanisme sistem imun melawan sel tumor	9
2.3 Mekanisme Aktifasi Makrofag oleh Isoflavon	11
3.1 Alur Penelitian	14
3.2 Pembagian area perhitungan pada <i>Coverslip</i> untuk menghitung jumlah latex yang difagosit oleh makrofag	18
4.1 Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap jumlah makrofag aktif per 100 makrofag	21
4.2 Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap jumlah <i>latex beads</i> yang difagosit oleh 100 makrofag	23
4.3 Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap indeks aktivitas fagositosis makrofag	25
4.4 Perbedaan aktivitas makrofag yang memfagosit <i>latex beads</i>	26

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Pembuatan Media Kultur Lengkap.....	36
B. Penentuan Dosis.....	36
C. Hasil Uji Statistik <i>Oneway</i> ANOVA Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Makrofag Aktif.....	37
D. Hasil Uji Statistik <i>Oneway</i> ANOVA Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Latex Beads yang Difagosit oleh Makrofag.....	38
E. Hasil Uji Statistik <i>Oneway</i> ANOVA Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Indeks Fagositosis Makrofag	40

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker mammae merupakan penyebab kematian kedua pada wanita setelah kanker serviks. Berdasarkan data dari *Pathological Based Registration* pada tahun 2005, kanker mammae di Indonesia mencapai 20.000 kasus baru per tahun. Sedangkan berdasarkan data *Global Burden of Cancer*, angka kejadian kanker mammae di Indonesia sebanyak 26 per 100.000 wanita (Bambang, 2010). Kanker mammae disebabkan karena adanya mutasi gen pada sel-sel kelenjar mammae. Pada umumnya, tubuh melakukan *immunosurveillance* terhadap sel-sel yang bermutasi untuk mencegah terjadinya kanker mammae, tetapi terkadang terjadi *immunological escape* (Batubara, 2006). Salah satu penyebab *immunological escape* adalah kegagalan sistem imun untuk mendeteksi sel yang bermutasi, sehingga menyebabkan sel kanker dapat berkembang (Igney dan Krammer, 2002). Pertumbuhan sel kanker mammae juga berkaitan erat dengan lemahnya sistem imun sebagai sistem pertahanan tubuh (Kusmardi *et al.*, 2006).

Upaya untuk mencegah kanker mammae sudah banyak dilakukan antara lain: pemeriksaan payudara sendiri (sadari), pemeriksaan mammografi, dan penggunaan obat hormonal (Luwia, 2003). Pencegahan yang umum dilakukan ini memiliki dampak yang merugikan seperti pada pemeriksaan mammografi, terpaparnya kelenjar mammae secara terus menerus oleh radiasi sinar ultraviolet dapat menjadi salah satu faktor resiko terjadinya kanker mammae, selain itu pencegahan kanker mammae dengan mammografi relatif mahal (Bustan, 2007). Oleh karena itu, dibutuhkan pencegahan alternatif yang lebih efektif dan murah untuk mencegah kanker mammae, salah satunya dengan cara meningkatkan aktivitas sel-sel imun di dalam tubuh.

Sel imun mampu melawan sel kanker karena sel imun mengenali sel kanker sebagai benda asing (antigen). Tubuh akan merespon sel kanker dengan imun secara humoral dan seluler. Sistem imun seluler yang berperan adalah sel T helper dan sel T sitotoksik. Th1 akan mensekresikan Interferon- γ (IFN- γ) dan *Macrofag Activation*

Factor (MAF) yang berperan dalam aktivasi makrofag. Makrofag teraktivasi akan meningkatkan kemampuannya untuk melawan sel kanker (Batubara, 2006). Sedangkan Th2 berperan penting dalam modulasi sistem imun terutama mempertahankan efek anti tumor dalam jangka panjang (Ujianto, 2010). Sekresi IFN- γ dan MAF oleh Th1 salah satunya dipengaruhi oleh kadar isoflavon di dalam tubuh (Afiyata *et al.*, 2011). Isoflavon termasuk senyawa fenolik aktif dari tumbuhan yang secara struktural mirip dengan estrogen, 17 β -estradiol pada mamalia (Mense *et al.*, 2008; Sabatier *et al.*, 2003). Zhang *et al.* (2008), menyatakan bahwa pemberian 90 mg ekstrak isoflavon dari buah semanggi merah dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit sebesar 55,56 %.

Salah satu bahan alami yang mengandung isoflavon dan dapat meningkatkan aktivitas makrofag adalah tempe kedelai. Tempe kedelai merupakan produk olahan dari kedelai yang difermentasi. Proses fermentasi pada tempe kedelai dapat meningkatkan kandungan isoflavon, peptida, polisakarida, glikoprotein dan nukleotida dibandingkan dengan kedelai tanpa fermentasi (Afiyata *et al.*, 2011). Nurfaiziyah (2011), menyatakan bahwa ekstrak tempe kedelai dengan dosis 12 mg/20 gram berat badan mencit/hari mampu meningkatkan aktivasi caspase-3 yang berperan dalam apoptosis sel kanker dan peningkatan aktivitas makrofag. Fihiruddin (2013), menyatakan bahwa kadar Imunoglobulin G serum pada mencit Balb/C meningkat setelah pemberian susu kedelai dengan dosis 0,7 ml/20 gram berat badan. Selain itu, penelitian dari Afiyata *et al.* (2011), juga menyatakan bahwa kemampuan fagositosis makrofag pada mencit jantan strain Balb/C yang tidak diinokulasi dengan sel kanker, meningkat setelah pemberian 0,5 gram jus tempe/hari selama 12 hari.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas fagositosis makrofag setelah diinokulasi dengan sel kanker mammae pada mencit C3H yang diberi tepung tempe kedelai, sehingga dapat diketahui peran tepung tempe kedelai dalam peningkatan sistem imun, khususnya dalam mencegah terjadinya kanker mammae.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian tepung tempe kedelai pada mencit C3H sebelum diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis makrofag?
2. Bagaimana pengaruh pemberian tepung tempe kedelai dengan beberapa variasi dosis terhadap aktivitas fagositosis makrofag?

1.3 Batasan Masalah

Pada penelitian ini, pengamatan aktivitas fagositosis dilakukan dengan menghitung jumlah makrofag aktif dan jumlah *latex beads* yang difagosit oleh 100 makrofag.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian tepung tempe kedelai pada mencit C3H sebelum diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* terhadap aktivitas fagositosis makrofag.
2. Mengetahui pengaruh beberapa variasi dosis tepung tempe kedelai terhadap aktivitas fagositosis makrofag.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi pemanfaatan tepung tempe kedelai untuk meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag terhadap sel *adenocarcinoma mammae*, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pencegahan kanker mammae yang mudah dan murah.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Respon Imun terhadap Kanker Mammae

Kanker mammae disebabkan karena adanya mutasi gen, yang mengakibatkan proliferasi dan apoptosis sel-sel kelenjar mammae menjadi tidak seimbang, yang selanjutnya disertai dengan invasi dan metastasis ke jaringan lain (Hondermarck, 2003; Haryana, 1995). Pada kanker mammae, yang merupakan tumor marker adalah gen BRCA 1 (*Breast Cancer type 1*) dan BRCA 2 (*Breast Cancer type 2*). Keberadaan gen BRCA 1 dan BRCA 2 tersebut dapat menyebabkan perkembangan kanker mammae. Selain itu, gen p53 juga berperan dalam perkembangan kanker mammae. Mutasi atau perubahan genetik pada gen p53 akan menyebabkan hilangnya kendali *check point* pada siklus sel, sehingga sel-sel dengan kerusakan DNA dapat masuk ke fase S dan tidak mengalami apoptosis. Hal tersebut selanjutnya memicu perkembangan sel-sel kanker mammae (Ujiyanto, 2010).

Menurut Sukardja (2000), sel-sel kanker memiliki perbedaan dibandingkan sel normal, yaitu:

- a. Sel kanker bersifat invasif, yang artinya sel-sel kanker tersebut dapat tumbuh menembus membran basal kemudian menyerang jaringan maupun organ disekitarnya.
- b. Sel kanker memiliki kemampuan proliferasi yang tidak terkendali.
- c. Sel kanker mampu merangsang pertumbuhan pembuluh darah baru untuk memberikan pasokan darah ke dalam sel-sel kanker tersebut.

Kanker mammae akan menstimulasi respon imun humoral maupun seluler. Hal ini terjadi karena sel kanker mengekspresikan molekul yang akan dikenali oleh sistem imun sebagai benda asing, meskipun sel kanker merupakan derivat dari sel tubuh sendiri. Sel kanker mengekspresikan antigen TAAs (*Tumor Associated Antigens*) dan TSAs (*Tumor Spesific Antigens*) yang akan berikatan dengan MHC II. Kompleks

antigen dan MHC II kemudian dikenali oleh sel limfosit T. Limfosit T akan bertindak sebagai efektor dan regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktivitas sel imun lain melalui sekresi limfokin (Kresno, 2003).

Pada dasarnya respon imun terdiri dari 3 tahapan, meliputi pengenalan, aktivasi dan efektor. Respon imun pada sel kanker diawali dengan pengenalan, yaitu peristiwa masuknya antigen dan penyajian antigen ke reseptor spesifik dari limfosit. Selanjutnya aktivasi respon imun sebagai akibat dari pengenalan antigen spesifik. Pada tahap ini limfosit akan mengalami 2 perubahan utama, yaitu limfosit akan berproliferasi sehingga jumlahnya bertambah dan berdiferensiasi menjadi sel yang berfungsi untuk mengeliminasi antigen. Interaksi makrofag sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) dengan limfosit T spesifik menyebabkan makrofag mensekresikan Interleukin-1 (IL-1) yang akan menstimulasi limfosit T *Helper* (limfosit Th) sehingga menghasilkan IL-2. IL-2 akan menginduksi sel lain, seperti limfosit B, prekursor *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) dan sel *Natural Killer* (NK). Tahap terakhir adalah efektor, yaitu sel imun melawan dan menghancurkan antigen target. Peran dari sistem imun ini disebut dengan *immunosurveillance* (Ujiyanto, 2010).

Sel imun yang berperan untuk melawan sel kanker adalah CTL, sel NK dan makrofag (Muryanto, 2007). CTL dan sel NK akan melawan sel kanker dengan cara mensekresikan perforin dan protease yang disebut granzim serta menggunakan reseptor TNF (*Tumor Necrosis Factor*) untuk menginduksi apoptosis. Sedangkan makrofag akan melawan sel kanker dengan cara fagositosis (Ujiyanto, 2010).

2.2 Peran Makrofag dalam Sistem Imun

Sistem imun sebagai mekanisme pertahanan tubuh meliputi sistem imun alami dan sistem imun adaptif. Sistem imun alami terdiri dari beberapa sistem pertahanan, antara lain: barrier epitel, fagosit, sel NK dan sistem komplemen. Sedangkan sistem pertahanan imun adaptif terdiri dari *cell mediated immunity* dan *humoral mediated immunity*. Dari beberapa sistem imun tersebut, sistem fagosit merupakan sistem

pertahanan paling utama karena mampu menembus epitel dalam memakan dan mencerna benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Sistem fagosit terdiri dari neutrofil dan monosit. Kedua sel tersebut bersirkulasi dalam darah dan bekerja pada tempat yang terinfeksi (Winarto, 2009).

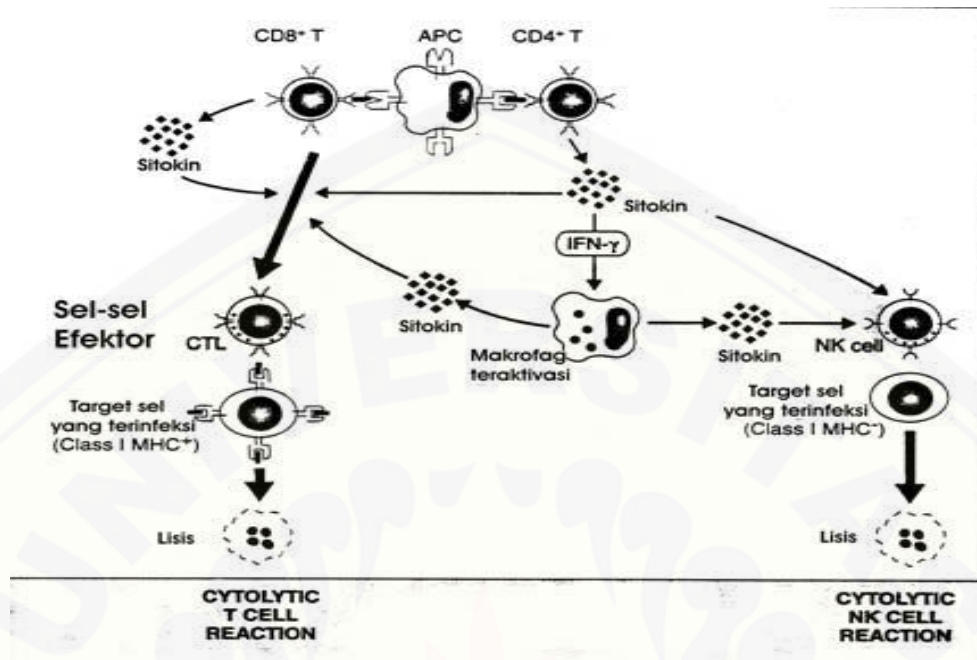
Neutrofil merupakan sel pertama yang berfungsi untuk merespon infeksi, baik infeksi dari jamur, bakteri maupun mikroba lain. Neutrofil diproduksi di sumsum tulang dengan jumlah normal antara 4.000-10.000 per mm^3 darah, jumlah ini akan meningkat sampai 20.000 per mm^3 darah jika terjadi infeksi dalam tubuh. Setelah diproduksi di sumsum tulang, neutrofil kemudian masuk dalam sirkulasi darah. Produksi neutrofil dirangsang oleh sitokin, yaitu mediator yang diproduksi oleh berbagai macam sel sebagai respon terhadap infeksi (Winarto, 2009). Sedangkan monosit berfungsi mencerna mikroba dan sel-sel rusak yang ada dalam jaringan dan darah. Jumlah sel monosit lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah sel neutrofil, yaitu 500-1000 per mm^3 darah. Monosit dapat masuk ke dalam jaringan ekstrasvaskuler dan bertahan dalam jangka waktu yang lebih lama. Selanjutnya monosit akan berdiferensiasi menjadi sel makrofag di dalam jaringan dengan fungsi yang sama seperti monosit, sehingga kedua jenis sel tersebut dinamakan dengan sistem fagosit mononuklear (Maryanti, 2009).

Makrofag adalah sel mononuklear yang terbentuk dari proses diferensiasi premonosit menjadi monosit kemudian menjadi makrofag. Ukuran makrofag 5-10 kali lebih besar dibandingkan dengan ukuran monosit yang hanya berkisar antara 10-15 μm (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Makrofag termasuk ke dalam sistem imun alami nonspesifik yang berfungsi untuk membunuh benda-benda asing maupun sel-sel yang mengalami kerusakan dengan cara fagositosis. Monosit diproduksi di sumsum tulang belakang kemudian diedarkan ke dalam sirkulasi darah, selanjutnya akan disimpan di dalam jaringan tubuh dalam bentuk makrofag (Difita, 2014).

2.3 Fagositosis Makrofag dan Perannya terhadap Sel Kanker

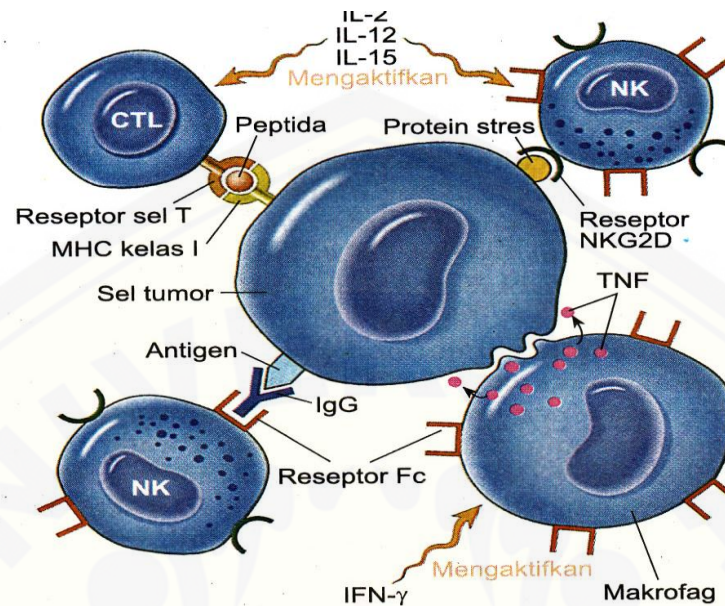
Makrofag memiliki kemampuan untuk melawan atau membunuh benda asing atau jaringan abnormal di dalam tubuh dengan cara fagositosis. Fagositosis secara garis besar dapat dibedakan dalam 3 tahap, yaitu: pengenalan dan pengikatan benda asing atau jaringan abnormal, penelanan (*ingestion*) dan pencernaan. Kemampuan fagositosis oleh makrofag jauh lebih kuat dibandingkan dengan sel fagosit yang lain seperti neutrofil. Segera setelah menelan benda asing, membran makrofag akan menutup, kemudian partikel tersebut digerakkan ke dalam sitoplasma sel dan terbentuk vakuola fagosit (fagosom). Selanjutnya lisosom yang merupakan kantong-kantong yang berisi berbagai jenis enzim, bersatu dengan fagosom membentuk fagolisosom. Pada keadaan ini mulai terjadi proses pencernaan intraseluler (Abbas *et al.*, 2000).

Untuk melawan sel kanker, makrofag memiliki dua proses penting, yaitu: makrofag sebagai APC (*Antigen presenting cell*) dan makrofag melakukan fagositosis secara langsung. Proses pertama, yaitu makrofag sebagai APC akan diaktifasi oleh IFN- γ (Interferon- γ). Setelah makrofag mengalami aktivasi, makrofag akan mempresentasikan antigen kanker pada sel limfosit Th. Selain itu, makrofag akan mensekresikan sitokin yang berfungsi untuk mengaktifkan sel-sel imun lain seperti sel NK dan limfosit-T sitotoksik (CTL) untuk melawan sel kanker. Peran makrofag sebagai APC hanya untuk mengaktifkan sel imun lain, tidak melawan sel kanker secara langsung (Khairinal, 2012).



Gambar 2.1 Mekanisme APC pada makrofag (Riyadi, 2008).

Proses kedua, yaitu makrofag yang melakukan fagositosis secara langsung, diawali dengan aktivasi makrofag oleh MAF (*Macrofage Activating Factor*), kemudian makrofag akan berikatan dengan tumor. Kemampuan makrofag berikatan dengan tumor karena makrofag memiliki reseptor Fc dari IgG. Makrofag dan IgG bekerja sama untuk melisiskan sel kanker. Makrofag aktif akan mensekresikan IL-12 (Interleukin-12) yang akan memicu proliferasi dan aktivasi sel T (CD4+), sel T (CD8+) dan sel NK. Selain itu, IL-12 juga memicu sekresi TNF (*Tumor Necrosis Factor*). TNF akan memicu berbagai respon imun seperti enzim lisosom, metabolit reaktif terhadap oksigen dan aktivitas NO (Nitrit Oksida) terhadap sel tumor sehingga menyebabkan sel tumor mengalami nekrosis. Hasil dari nekrosis tersebut berupa debris-debris sel yang akan difagosit kembali oleh makrofag (Muryanto, 2007).



Gambar 2.2 Mekanisme sistem imun melawan sel tumor (Kumar *et al.*, 2007; Muryanto, 2007).

Untuk membunuh sel kanker, makrofag dapat diaktifasi oleh beberapa mediator dan senyawa-senyawa tertentu (Lorsbach *et al.*, 1993). Salah satu senyawa yang dapat meningkatkan aktivasi makrofag adalah isoflavon. Adanya isoflavon mempengaruhi IFN- γ (Interferon- γ) dan MAF (*Macrophag Activation Factor*). Adanya IFN- γ dan MAF akan mempengaruhi aktivasi dan peningkatan kemampuan fagositosis makrofag (Afiyata *et al.*, 2011).

2.4 Kandungan Tempe Kedelai dan Fagositosis Makrofag

Tempe adalah salah satu produk olahan dengan bahan baku kedelai yang diproses melalui fermentasi. Kedelai mengandung isoflavon yang termasuk dalam senyawa fenolik aktif dari tumbuhan yang secara struktural mirip dengan estrogen, 17β -estradiol pada mamalia (Mense *et al.*, 2008; Sabatier *et al.*, 2003). Hasil analisis isoflavon pada tepung tempe kedelai yang dilakukan oleh safrida dapat dilihat pada tabel 2.1:

Tabel 2.1 Hasil analisis senyawa isoflavon tepung tempe kedelai

Komponen	Kandungan Isoflavon Dalam Tepung Tempe Kedelai (mg/kg bk)
Genistein	250,65
Daidzein	555,55
Glisitein	95,04
Total isoflavon	901,24

Keterangan: bk = berat kering (Safrida, 2008).

Isoflavon di dalam kedelai yang terdiri dari daidzein, glisitein dan genistein berperan sebagai antioksidan non enzimatis. Genistein mampu menginduksi ekspresi caspase-3 yang berperan dalam apoptosis sel kanker secara *in vivo* (Nurfaiziyah *et al.*, 2011). Pada kedelai yang sudah difermentasi menjadi tempe, terdapat juga antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan sangat kuat. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus tuteus* dan *Coreyne bacterium* (Pawiroharsono, 2001). Zat antioksidan ini sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker dan kematian sel (Miladiyah, 2004). Antioksidan mampu mengaktifkan sel T yang akan melepaskan limfokin seperti *interferon* (IFN). Limfokin-limfokin tersebut akan mengaktifkan makrofag dan meningkatkan efek sitotoksik (Baratawidjaja, 2000).

Afiyata *et al.* (2011), menyatakan bahwa isoflavon yang berasal dari tempe kedelai memiliki aktivitas antitumor lebih kuat dibandingkan dengan isoflavon kedelai karena efek dari fermentasi. Lebih lanjut dikatakan bahwa kandungan polisakarida, glikoprotein dan nukleotida pada tempe juga lebih mudah dicerna oleh tubuh dibandingkan dengan kedelai yang tidak difermentasi. Adanya proses fermentasi pada tempe kedelai ini dapat menstimulasi aktifasi sistem imun terutama aktifasi makrofag.

Selain kandungan isoflavon, tempe kedelai juga mengandung zink dan senyawa seperti fitosterol, saponin, asam fitat dan inhibitor protease yang merupakan zat aktif yang dapat mempengaruhi kemampuan fagositosis makrofag (Koswara, 2006). Zink

adalah salah satu mineral yang mempunyai efek positif terhadap sistem imun. Zink berperan untuk maturasi dan diferensiasi sel T, inhibitor apoptosis, mengaktifkan timulin, serta menstimulasi produksi IFN- γ (Afiyata *et al.*, 2011). Menurut Wahidah (2010), pemberian suplemen mikromineral seng (Zn) dengan dosis 0,078; 0,168; dan 0,260 mg/ekor/hari berpengaruh terhadap indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c. Proses aktivasi makrofag yang dipengaruhi oleh isoflavon dapat dilihat pada gambar 2.3 berikut:



Gambar 2.3 Mekanisme Aktivasi Makrofag oleh Isoflavon

2.5 Hipotesis

Pemberian tepung tempe kedelai pada mencit C3H sebelum diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2015, di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Jember dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu unit 3 (LPPT3), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah papan bedah, pinset, gunting bedah ujung tumpul, *sput injection*, *conical tube* 15 ml (Iwaki), *sentrifuge*, *haemocytometer*, *microplate 24 well (tissue culture plate)* (Iwaki), *coverslip* (SPL), mikropipet, mikrotip, *microtube*, vortex, inkubator CO₂ 5%, mikroskop *inverted* (Olympus) dan LAF (*Laminar Air Flow*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit C3H umur 5 minggu, tepung tempe kedelai, sel *adenocarcinoma mammae*, *latex beads* (Sigma LB30, diameter 3,0 µm), kloroform, alkohol 70%, medium RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (Gibco), medium komplit (MK) (Lampiran A), FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco), fungizon (Gibco), penisilin-streptomisin (Gibco), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), metanol absolut (E-Merck), Giemsa 20% (E-Merck), dan aquades.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni yang dilakukan di laboratorium secara *in vitro*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design* dengan tujuan untuk menguji pengaruh perlakuan pada

kelompok eksperimen dengan cara membandingkan dengan kontrol. Pada penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok dengan 3 kali ulangan, yaitu:

Kelompok 1 : mencit kontrol negatif (tidak diberi tepung tempe kedelai dan tidak diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*).

Kelompok 2 : mencit kontrol positif (tidak diberi tepung tempe kedelai dan diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*).

Kelompok 3 : diberi tepung tempe kedelai dosis 0,8 gram dan diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*.

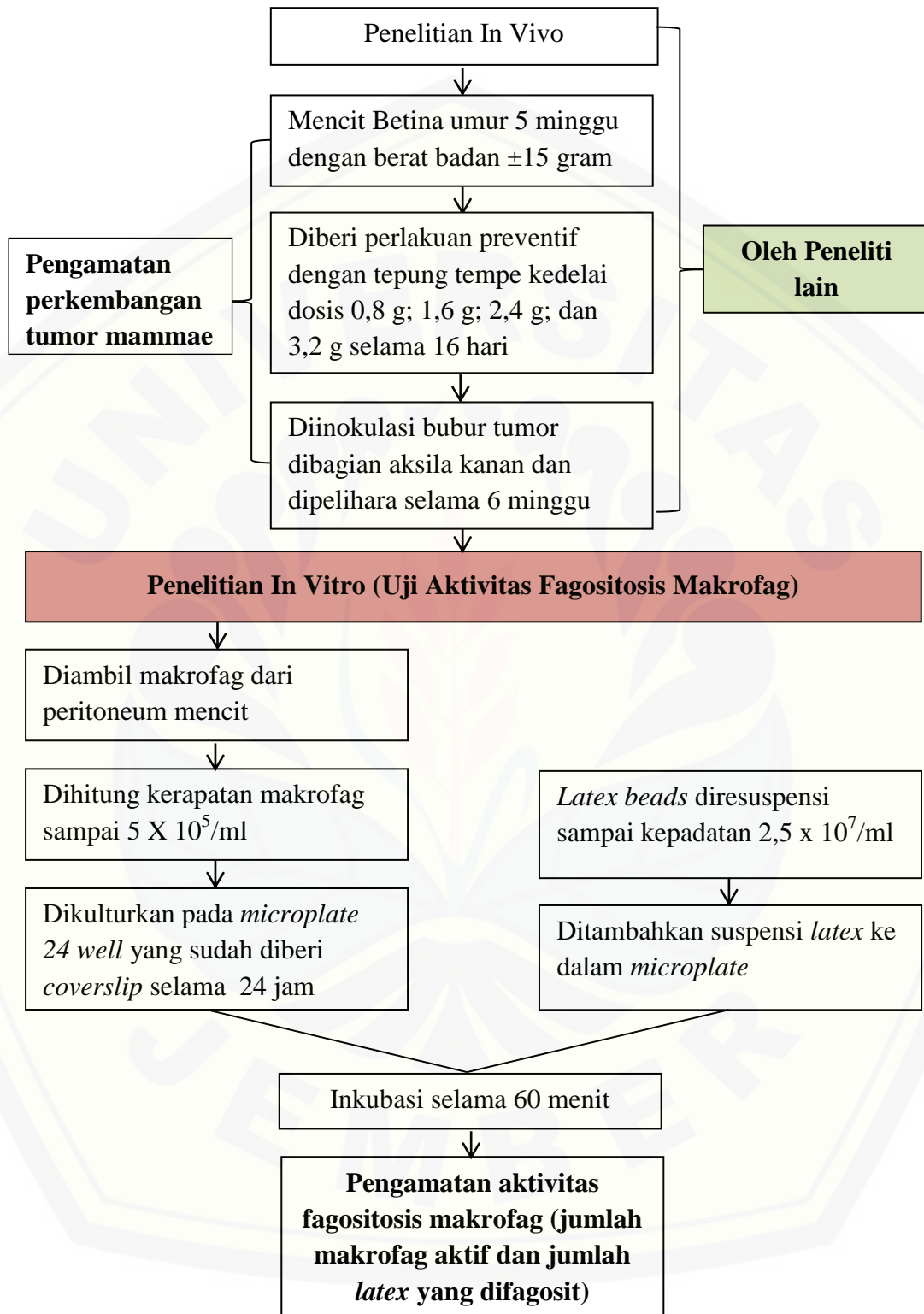
Kelompok 4 : diberi tepung tempe kedelai dosis 1,6 gram dan diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*.

Kelompok 5 : diberi tepung tempe kedelai dosis 2,4 gram dan diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*.

Kelompok 6 : diberi tepung tempe kedelai dosis 3,2 gram dan diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*.

3.4 Prosedur Penelitian

Secara keseluruhan rangkaian kegiatan penelitian pemanfaatan tepung tempe kedelai untuk peningkatan aktivitas fagositosis makrofag sebagai salah satu cara pencegahan terjadinya kanker mammae yang dilaksanakan, dapat dilihat pada Gambar 3.1:



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.4.1 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit betina strain C3H umur 5 minggu dengan berat badan ± 15 gram, berjumlah 18 yang dibagi menjadi 6 kelompok dengan 3 kali ulangan. Mencit dipelihara di dalam kandang berupa bak plastik dengan ukuran 30 x 20 x 15 cm³ dengan alas berupa sekam yang diganti setiap satu minggu sekali dan atap berupa ram kawat. Mencit diberi pakan pellet AD II sebanyak 25 gram per hari dan air minum yang diberikan secara *ad libitum*. Pemeliharaan dilakukan di laboratorium dengan suhu 27-30°C dan kelembaban 75-90% kondisi ini disesuaikan dengan lingkungan hidup mencit secara alami.

3.4.2 Pembuatan Tepung Tempe Kedelai

Tempe kedelai yang digunakan adalah tempe kedelai produksi salah satu penghasil tempe di Jember yang telah difermentasi selama 48 jam, kemudian tempe dipotong dadu dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm, selanjutnya potongan tempe dikeringkan dalam oven pada suhu 45°C selama 24 jam untuk menghilangkan kadar air dalam tempe. Tempe yang sudah kering, dihaluskan menggunakan mesin grinder, kemudian diayak dengan ukuran ayakan 70 mesh sehingga diperoleh tepung tempe kedelai.

3.4.3 Penentuan Dosis dan Aplikasi

Dosis tepung tempe kedelai yang diaplikasikan pada hewan uji berdasarkan hasil penelitian efek genistein pada sel MCF-7 secara *in vitro* yaitu, $LC_{50} = 208,31$ µg/ml (Mahriani dan Utami, 2014) dan hasil HPLC tepung tempe kedelai yang mengandung genistein sebesar 250,65 mg/kg berat kering (Safrida, 2008). Dosis tersebut setara dengan 0,8 g tepung tempe kedelai yang diaplikasikan secara *in vivo* (Lampiran B). Sehingga dosis yang digunakan untuk penelitian ini adalah 0,8 g, 1,6 g, 2,4 g dan 3,2 g. Masing-masing dosis tepung tempe kedelai tersebut, dilarutkan dalam aquades. Pemberian tepung tempe dilakukan secara *gavage* sebanyak 1 ml dalam satu kali sehari selama 16 hari. Setelah aplikasi tepung tempe kedelai, mencit diinokulasi dengan sel *adenocarcinoma mammae*.

3.4.4 Pembuatan dan Inokulasi Sel *Adenocarcinoma Mammae*

Mencit donor dimatikan dengan kloroform, kemudian dibedah dan diambil semua jaringan tumornya. Jaringan tumor dibersihkan dengan PBS di dalam cawan petri yang diletakan di atas es. Selanjutnya jaringan tumor yang sudah bersih ditambah dengan larutan PBS dan dicacah sampai menjadi bubur tumor yang homogen. Bubur tumor disuntikkan pada mencit resipien secara subkutan di bagian aksila kanan sebanyak 0,2 ml (\pm mengandung 10^6 sel tumor hidup). Selanjutnya, mencit dipelihara selama 6 minggu.

3.4.5 Isolasi Makrofag

Makrofag diambil dari peritoneum mencit bertumor dari hewan uji yang telah diinokulasi dengan sel *adenocarcinoma mammae* dan sebagai kontrol negatif diambil dari mencit normal. Mencit dibius menggunakan kloroform, diletakkan pada posisi terlentang dan seluruh permukaan perutnya diolesi dengan alkohol 70%. Kemudian dibuat irisan kecil pada kulit bagian medial perut menggunakan gunting, dirobek bagian kulitnya kearah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Selanjutnya peritoneum dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 5 ml medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu 3 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan. Cairan peritoneum diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ bagian dalam dengan 2 jari.

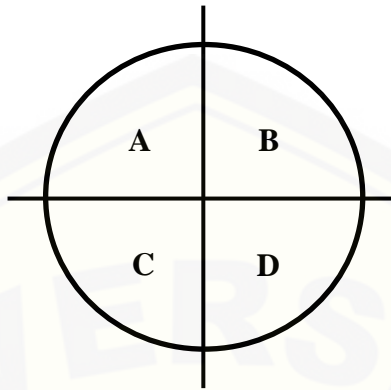
Aspirat yang diperoleh, kemudian ditampung dalam *conical tube* dan disentrifuge dengan kecepatan 1.200 rpm, 4°C, selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian pelet ditambahkan dengan 1 ml media komplit dan diresuspensi. Jumlah sel yang diperoleh, dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Sel yang telah dihitung, kemudian dibuat dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /ml dengan menambahkan medium lengkap.

Suspensi makrofag tersebut dikulturkan pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslip*, setiap sumuran berisi 200 μ l (5×10^5 /ml), kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 30 menit. Suspensi sel ditambahkan

media lengkap sampai volume menjadi 1 ml/sumuran, diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 2 jam. Selanjutnya media dibuang dan ditambahkan media lengkap lagi masing-masing 1 ml/sumuran, diinkubasi dalam inkubator CO₂, 5%, suhu 37°C selama 24 jam.

3.4.6 Pengujian Aktifitas Fagositosis Makrofag

Makrofag yang sudah diinkubasi selama 24 jam pada *microplate 24 well*, dicuci dengan RPMI sebanyak 2x. *Latex beads* sebanyak 10 µl disuspensi dengan medium lengkap sebanyak 1 ml sehingga diperoleh kepadatan $2,5 \times 10^7$ /ml. Suspensi *latex* ditambahkan ke dalam sumuran sebanyak 200 µl/sumuran (5×10^6 *latex*), diinkubasi selama 60 menit pada inkubator CO₂, 5% suhu 37°C. Suspensi dicuci dengan PBS sebanyak 3x untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit, kemudian dikeringkan pada suhu ruang, difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Metanol dibuang, kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan Giemsa 20% selama 20 menit, dicuci dengan aquades sampai bersih dan dikeringkan pada suhu ruang. *Coverslip* diangkat dari sumuran dan dilakukan penghitungan jumlah makrofag aktif dan jumlah *latex beads* yang difagosit dalam 100 makrofag, di bawah mikroskop *inverted*, dengan pengulangan perhitungan 3 kali. Perhitungan aktivitas fagositosis makrofag dilakukan dengan cara membagi *coverslip* menjadi 4 bagian. Selanjutnya dihitung jumlah *latex* yang difagosit oleh 25 makrofag pada masing-masing bagian, sehingga jumlah makrofag yang dihitung aktivitas fagositosisnya terhadap *latex* adalah 100 makrofag. Berikut ini pembagian area perhitungan pada *coverslip*:



Gambar 3.2 Pembagian area perhitungan pada *Coverslip* untuk menghitung jumlah makrofag aktif dan jumlah latex yang difagosit oleh makrofag

Aktivitas fagositosis makrofag dapat diukur dengan menghitung indeks fagositosis dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks fagositosis} = \frac{\text{Jumlah Makrofag Aktif}}{\text{Jumlah Makrofag Total (100)}} \times \frac{\text{Jumlah latex yang difagosit}}{\text{Jumlah makrofag aktif}}$$

(Difita, 2014).

3.5 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati, meliputi jumlah makrofag aktif dan jumlah *latex* yang difagosit dalam 100 makrofag yang dihitung di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan pengulangan perhitungan sebanyak 3 kali. Hasil perhitungan kemudian digunakan untuk mengukur indeks fagositosis makrofag (Batubara, 2006).

3.5 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan uji ANOVA *one way* dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$, dilanjutkan dengan analisis lanjutan menggunakan analisis *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan (Sugiyono, 2010).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Makrofag Aktif pada Mencit C3H

Makrofag aktif memiliki beberapa ciri-ciri, yaitu: 1) kemampuan *killling*-nya terhadap mikroorganisme meningkat, 2) dapat memacu inflamasi akut dengan mengeluarkan mediator-mediator inflamasi, 3) efisiensi sebagai APC akan meningkat, serta 4) dapat membunuh dan memfagosit sel-sel kanker (Riyadi, 2008). Makrofag aktif tidak dapat dilihat dari strukturnya, tetapi dapat dilihat dari aktivitasnya. Salah satu aktivitas yang dapat digunakan sebagai indikator makrofag aktif adalah aktivitas memfagosit *latex beads*.

Jumlah makrofag aktif dihitung pada 100 makrofag yang dipilih secara acak. Hasil penghitungan jumlah makrofag aktif pada mencit C3H yang diberi tepung tempe kedelai sebelum diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rata-rata jumlah makrofag aktif dalam 100 sel makrofag mencit C3H

Perlakuan	$\bar{x} \pm SD$
Kontrol Negatif	50,67 ± 3,51 ^a
Kontrol Positif (D0)	66,67 ± 8,51 ^b
D 1	83,33 ± 3,06 ^c
D 2	91,00 ± 7,81 ^{cd}
D 3	95,33 ± 3,06 ^d
D 4	87,67 ± 1,16 ^{cd}

keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$. D1: Dosis 0,8 g, D2: Dosis 1,6 g, D3: Dosis 2,4 g dan D4: Dosis 3,2 g.

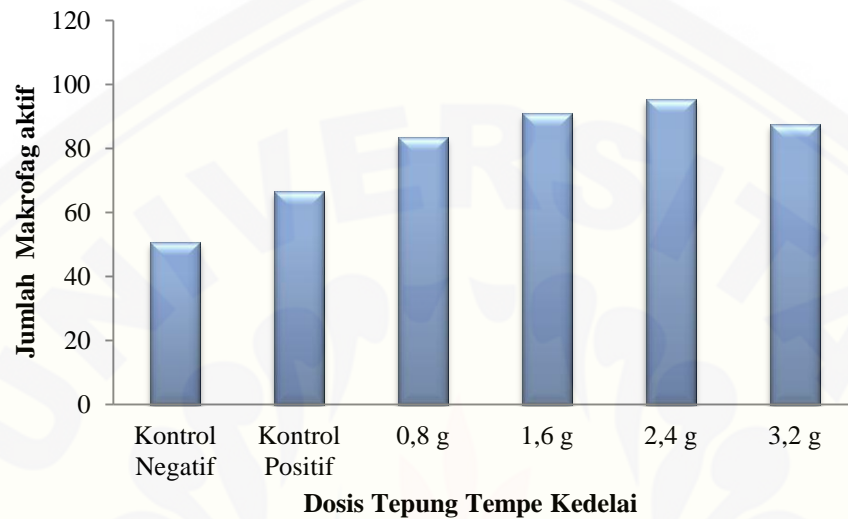
Berdasarkan hasil analisis *One Way Anova* (Lampiran C), diperoleh nilai $p = 0,000 < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara kontrol dan perlakuan. Pada Tabel 4.1 tampak bahwa terdapat perbedaan yang nyata

antara kontrol negatif dengan kontrol positif, antara kontrol dengan dosis 1, 2, 3 dan 4, sedangkan dosis 2 dan 4 tidak berbeda nyata.

Perbedaan yang nyata antara kontrol negatif dan kontrol positif diduga karena adanya gangguan di dalam tubuh yang berupa kanker mammae. Kanker memiliki antigen yang berfungsi sebagai kemoatraktan, sehingga monosit yang berada di dalam aliran darah segera berdiferensiasi menjadi sel makrofag dan bermigrasi menuju jaringan yang mengalami gangguan. Pada jaringan, makrofag dapat berproliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis yang lebih banyak (Efendi, 2003 dan Sudiana, 2008). Makrofag pada jaringan akan mengalami aktivasi karena antigen TAAs (*Tumor Associated Antigens*) dan TSAs (*Tumor Spesific Antigens*) dari kanker mammae. Antigen ini akan dikenali oleh limfosit T yang kemudian mensekresikan IFN- γ dan MAF untuk mengaktifkan makrofag (Kresno, 2003). Berbeda dengan kontrol negatif dan positif yang tidak berbeda nyata pada jumlah *latex* yang difagosit oleh makrofag dan indeks fagositosis. Hal ini terjadi karena adanya sel kanker diduga hanya dapat meningkatkan makrofag aktif, tetapi tidak dapat meningkatkan kemampuan makrofag untuk memfagosit, sehingga dibutuhkan senyawa aktif untuk meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag, seperti isoflavon dalam tepung tempe kedelai.

Perbedaan yang nyata antara kontrol dan perlakuan, diduga karena adanya pengaruh pemberian tepung tempe kedelai yang mengandung isoflavon. Isoflavon akan meningkatkan maturasi dan proliferasi sel T, yang akan mensekresikan IFN- γ dan MAF untuk mengaktifkan makrofag, sehingga kemampuan fagositosisnya meningkat (Afiyata *et al.*, 2011). Jumlah rata-rata makrofag aktif meningkat pada dosis 1 sampai dosis 3. Sedangkan pada dosis 4, terjadi penurunan jumlah rata-rata makrofag aktif. Hal ini, diduga dosis tinggi tepung tempe kedelai akan meningkatkan kadar estrogen dalam tubuh. Estrogen yang tinggi akan meningkatkan proliferasi sel kanker mammae dan meningkatkan sekresi TGF- α yang mampu menghambat aktivasi makrofag melalui penghambatan proliferasi dan maturasi sel T (Chodidjah, 2009 dan Mosser, 2003). Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap jumlah makrofag

aktif mencit C3H yang diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap jumlah makrofag aktif per 100 makrofag

4.2 Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah *Latex Beads* yang Difagosit oleh Makrofag Mencit C3H

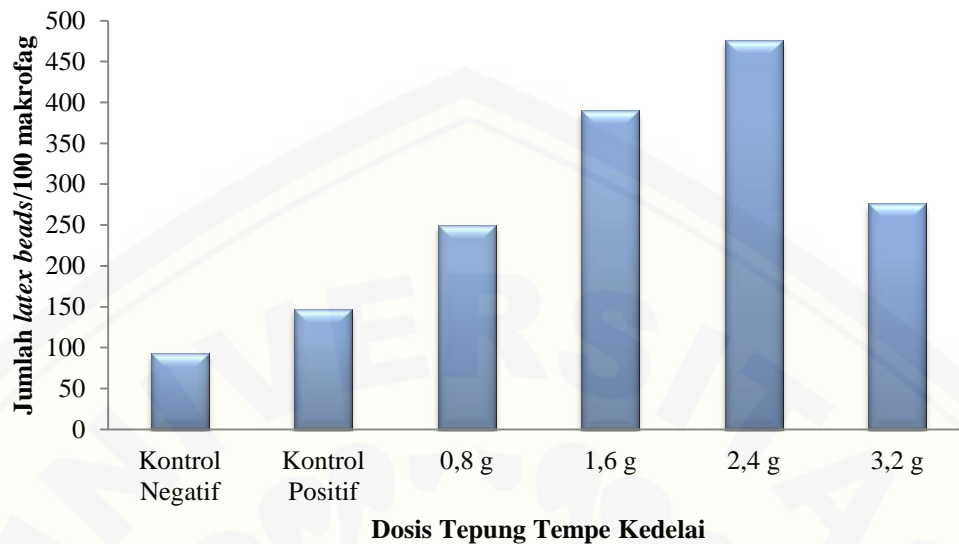
Jumlah *latex beads* yang difagosit oleh makrofag dihitung pada 100 makrofag secara acak. Perhitungan jumlah *latex* yang difagosit berfungsi untuk mengetahui kemampuan fagositosis makrofag aktif terhadap benda asing (kanker mammae). Hasil penghitungan jumlah *latex* yang difagosit oleh makrofag mencit C3H yang diberi tepung tempe kedelai sebelum diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Rata-rata jumlah *latex beads* yang difagosit oleh 100 sel makrofag mencit C3H

Perlakuan	$\bar{x} \pm SD$
Kontrol Negatif	93,00 \pm 7,00 ^a
Kontrol Positif (D0)	147,00 \pm 62,75 ^a
D 1	249,33 \pm 13,65 ^{ab}
D 2	390,33 \pm 225,63 ^b
D 3	475,67 \pm 177,57 ^b
D 4	276,00 \pm 41,62 ^{ab}

keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$. D1: Dosis 0,8 g, D2: Dosis 1,6 g, D3: Dosis 2,4 g dan D4: Dosis 3,2 g.

Berdasarkan hasil analisis *One Way Anova* (Lampiran D), diperoleh nilai $p = 0,019 < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara kontrol dan perlakuan. Pada Tabel 4.2, tampak bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara kontrol dengan dosis 2 dan 3, sedangkan antara kontrol negatif dan positif, antara dosis 1 dan 4, serta antara dosis 2 dan 3 tidak terdapat perbedaan yang nyata. Meskipun antar perlakuan tidak berbeda nyata, tetapi rata-rata jumlah latex yang difagosit mengalami peningkatan. Pada dosis 4, jumlah rata-rata *latex* yang difagosit mengalami penurunan tetapi tidak terdapat perbedaan yang nyata antara dosis 4 dengan dosis 1, 2 dan 3. Jumlah latex yang difagosit oleh makrofag berkaitan dengan aktivitas fagositosis makrofag, semakin banyak jumlah *latex* yang difagosit, maka semakin tinggi aktivitas fagositosis makrofag. Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap jumlah latex yang difagosit oleh makrofag mencit C3H yang diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap jumlah *latex beads* yang difagosit oleh 100 makrofag

4.3 Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Indeks Fagositosis Makrofag pada Mencit C3H

Indeks fagositosis makrofag digunakan untuk mengetahui aktivitas fagositosis makrofag. Hasil penghitungan indeks fagositosis pada mencit C3H yang diberi tepung tempe kedelai sebelum diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Rata-rata indeks fagositosis makrofag mencit C3H yang diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae*

Perlakuan	$\bar{x} \pm SD$
Kontrol Negatif	$0,93 \pm 0,070^a$
Kontrol Positif (D0)	$1,47 \pm 0,63^a$
D 1	$2,49 \pm 0,14^{ab}$
D 2	$3,90 \pm 2,26^b$
D 3	$4,76 \pm 1,78^b$
D 4	$2,76 \pm 0,42^{ab}$

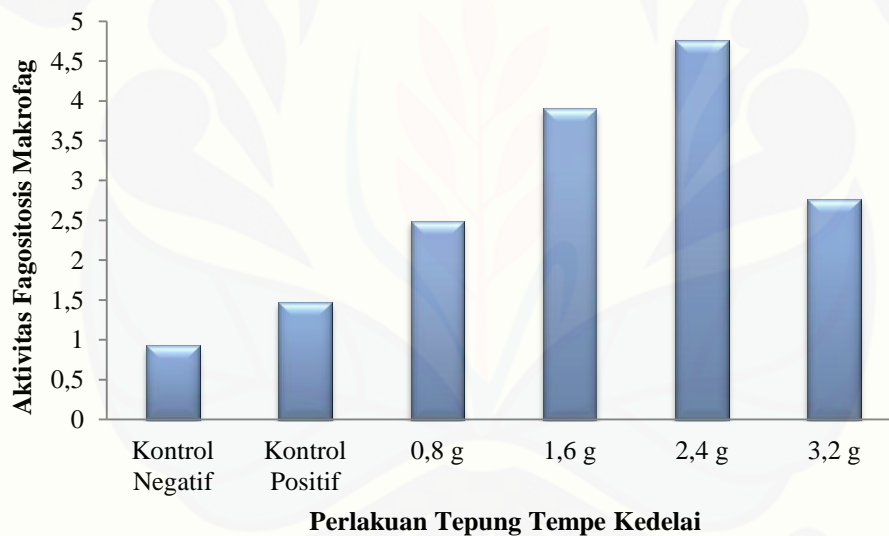
keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$. D1: Dosis 0,8 g, D2: Dosis 1,6 g, D3: Dosis 2,4 g dan D4: Dosis 3,2 g.

Berdasarkan hasil analisis *One Way Anova* (Lampiran E), diperoleh nilai $p = 0,019 < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara kontrol dan perlakuan. Pada Tabel 4.3, tampak bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara kontrol dengan dosis 2 dan 3, sedangkan antara kontrol negatif dan positif, antara dosis 1 dan 4, serta antara dosis 2 dan 3 tidak terdapat perbedaan yang nyata. Hasil analisis yang diperoleh ini sama dengan jumlah *latex* yang difagosit makrofag karena aktivitas fagositosis berkaitan erat dengan jumlah *latex* yang difagosit.

Pada kontrol positif dan negatif tidak terdapat perbedaan yang nyata, tetapi rata-rata jumlah *latex* yang difagosit mengalami peningkatan. Hal ini diduga karena pada kontrol negatif dan positif tidak diberi tepung tempe kedelai. Gangguan dalam tubuh yang berupa kanker *mammae* tidak memberikan peningkatan yang signifikan pada kemampuan fagositosis makrofag karena tidak adanya tepung tempe kedelai yang diduga dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag (Afiyata *et al.*, 2011).

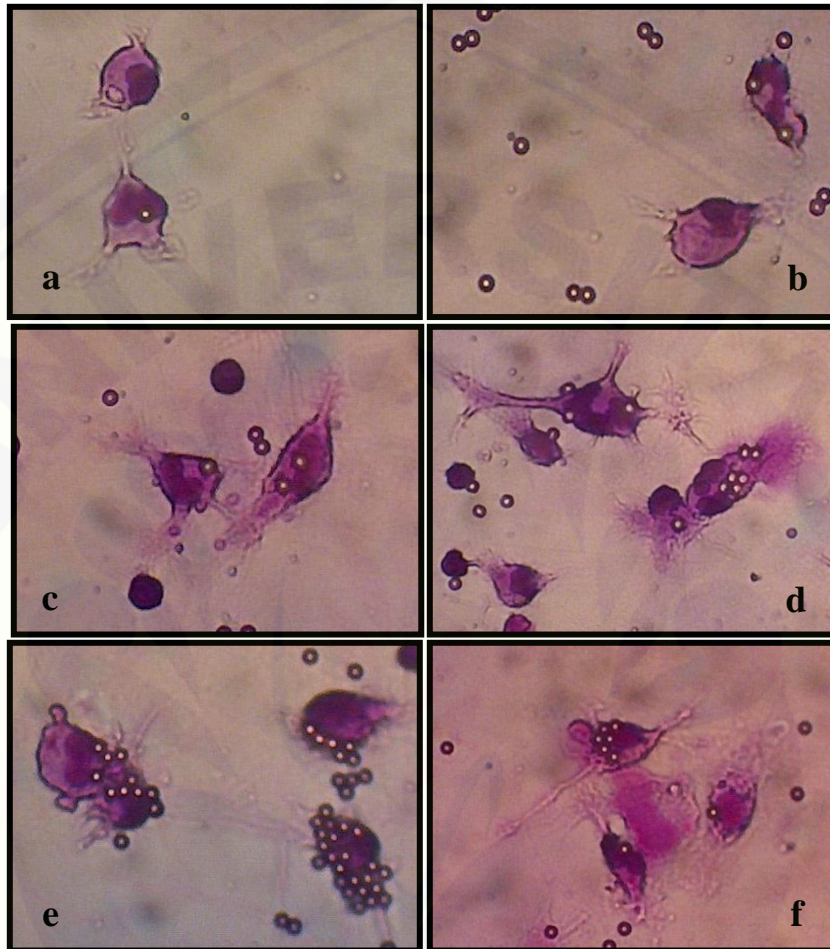
Pada dosis 1 tidak berbeda nyata dengan kontrol karena diduga dosis yang digunakan terlalu rendah, sehingga tidak berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis makrofag. Perbedaan yang nyata terdapat pada kontrol dan perlakuan (dosis 2 dan 3), diduga karena adanya pengaruh pemberian tepung tempe kedelai. Tepung tempe kedelai mengandung isoflavon. Isoflavon akan meningkatkan maturasi dan proliferasi

sel T, yang akan mensekresikan IFN- γ dan MAF yang berperan untuk mengaktifkan makrofag, sehingga kemampuan fagositosisnya meningkat (Afiyata *et al.*, 2011). Pada dosis 4 tidak berbeda nyata dengan dosis 1, 2 dan 3, tetapi rata-rata indeks fagositosis mengalami penurunan. Hal ini diduga karena Isoflavon yang terkandung dalam tepung tempe kedelai mirip dengan estrogen endogen (17β -estradiol). Kadar estrogen endogen yang tinggi di dalam tubuh akan meningkatkan proliferasi sel kanker mammae. Peningkatan proliferasi sel kanker akan disertai dengan peningkatan sekresi TGF- α yang bersifat immunosupresor (Mosser, 2003). Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap indeks fagositosis makrofag mencit C3H yang diinokulasi sel *Adenocarcinoma mammae* dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Grafik pengaruh tepung tempe kedelai terhadap indeks aktivitas fagositosis makrofag

Gambaran makrofag pada setiap perlakuan dosis tepung tempe kedelai dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Perbedaan aktivitas makrofag yang memfagosit *latex beads* a) Kontrol Negatif; b) Kontrol Positif; c) Dosis 0,8 g; d) Dosis 1,6 g; e) Dosis 2,4 g dan f) Dosis 3,2 g.

Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag terjadi karena perlakuan tepung tempe kedelai yang mengandung isoflavon, yaitu senyawa fenolik aktif dari tumbuhan yang secara struktural mirip dengan estrogen, 17β -estradiol pada mamalia (Mense *et al.*, 2008; Sabatier *et al.*, 2003). Jenis-jenis isoflavon dalam tempe kedelai, yaitu daidzein, glisitein dan genistein (Nurfaiziyah, 2011). Senyawa isoflavon dari jenis genistein dan daidzein yang ada pada tepung tempe kedelai memiliki waktu

paruh dalam tubuh orang dewasa selama 6-8 jam, tetapi konsumsi tepung tempe kedelai yang mengandung senyawa isoflavon secara terus menerus akan menghasilkan konsentrasi isoflavon plasma yang tinggi dan menetap di dalam tubuh (Cassidy dan Bingham, 1995).

Kandungan isoflavon pada tempe dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag karena isoflavon mampu meningkatkan aktivitas sel T yang meliputi peningkatan proliferasi dan maturasi dari sel T. Sel T tersebut akan mensekresikan limfokin, antara lain IFN- γ dan MAF. IFN- γ dan MAF ini yang selanjutnya akan mengaktifkan makrofag (Afiyata *et al.*, 2011). Selain itu, pada kedelai yang sudah difermentasi menjadi tempe, terdapat juga antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan sangat kuat. Zat antioksidan ini sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker dan kematian sel (Miladiyah, 2004). Zat antioksidan bekerja sama dengan zink yang terkandung dalam tempe kedelai mampu mengaktifkan sel T yang akan melepaskan limfokin seperti IFN- γ . Limfokin tersebut akan mengaktifkan makrofag dan meningkatkan efek sitotoksik makrofag dengan cara mensekresikan senyawa-senyawa toksik bagi sel kanker (Baratawidjaja, 2000).

Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag pada mencit C3H yang diberi tepung tempe kedelai sebelum diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae* lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Rata-rata aktivitas fagositosis makrofag terus meningkat sesuai dengan peningkatan dosis tepung tempe kedelai yang diberikan, tetapi pada dosis 4 (3,2 g) aktivitas fagositosis makrofag mengalami penurunan. Aktivitas fagositosis makrofag mengalami penurunan diduga sebagai akibat pemberian isoflavon yang terkandung dalam tepung tempe kedelai. Struktur isoflavon pada tempe mirip dengan estrogen pada mamalia menyebabkan isoflavon memiliki aktivitas estrogenik, bahkan isoflavon memiliki aktivitas estrogenik yang lebih tinggi dibandingkan dengan stilbestrol (obat estrogenik). Aktivitas estrogenik pada isoflavon ini terkait dengan strukturnya yang dapat ditransformasikan menjadi equol, yaitu struktur fenolik yang

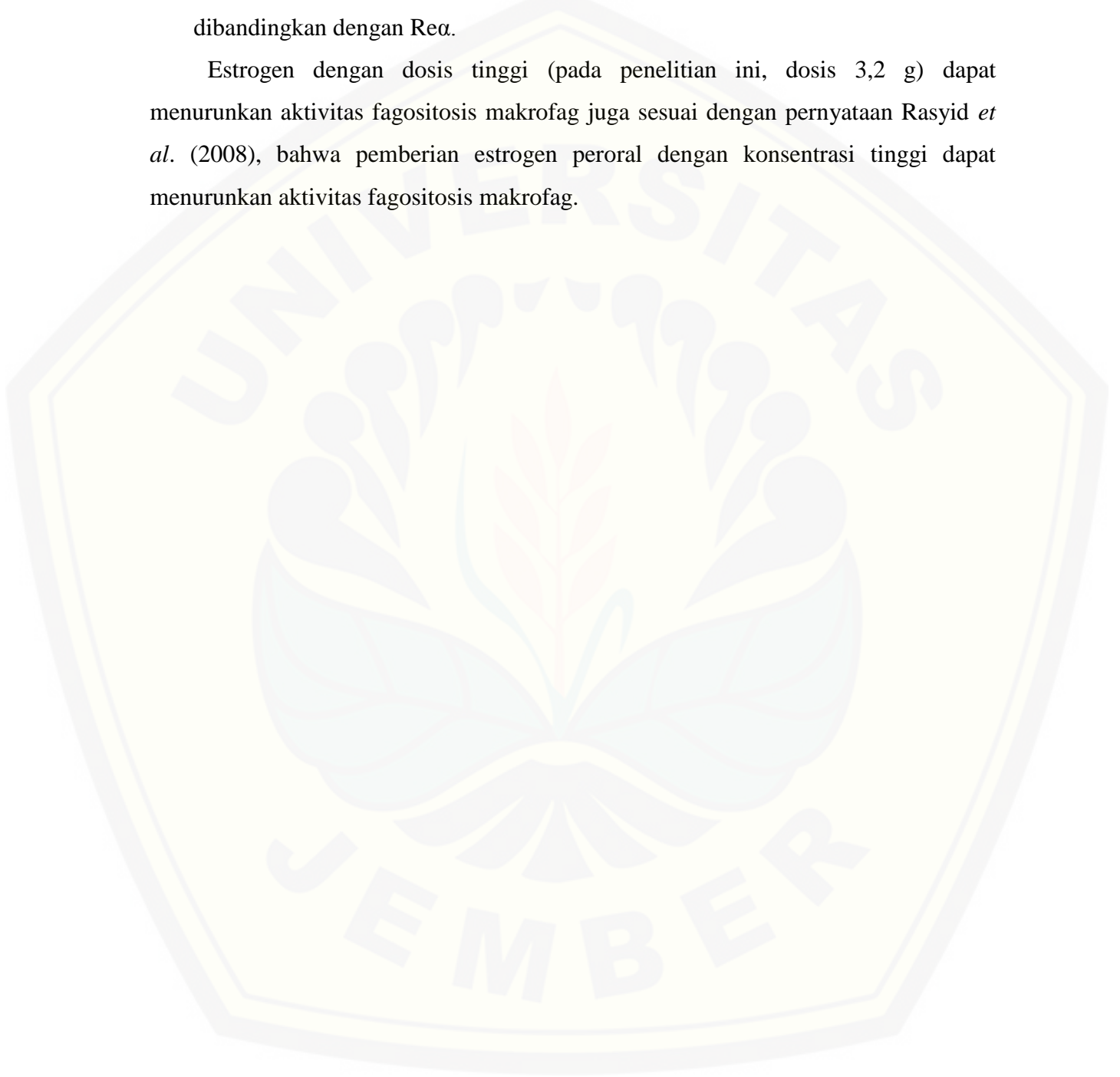
mirip dengan hormon estrogen (Pawiroharsono, 2007 dan Lambert *et al.*, 2015). Isoflavon dalam jumlah tertentu mampu mencegah terjadinya kanker mammae dengan cara meningkatkan aktivitas sel imun yaitu makrofag, sedangkan kadar isoflavon tinggi akan meningkatkan resiko kanker mammae karena menyebabkan proliferasi sel kanker mammae semakin tinggi (Clarke *et al.*, 2010). Stimulasi proliferasi sel kanker mammae oleh estrogen terjadi melalui reseptor estrogen α yang dapat meningkatkan peluang propagasi mutasi oleh agen karsinogenik.

Proliferasi sel kanker akan disertai dengan sekresi *growth promoters* (*Transforming Growth Factor* atau TGF- α), *fibroblast growth factor* dan *growth inhibitor*. TGF- α terlibat dalam mekanisme autokrin dari kanker. Produksi TGF- α tergantung pada hormon estrogen, sehingga interaksi antara hormon, reseptor hormon pada sel kanker dan TGF- α autokrin merangsang sel kanker lebih progresif (Dickson and Lippman, 1997). Selain terlibat dalam perkembangan sel kanker, TGF- α juga merupakan sitokin yang bersifat immunosupresor. Keberadaan TGF- α menyebabkan terhambatnya proliferasi dan maturasi sel limfosit T, sehingga sel limfosit T tidak mampu mensekresikan limfokin (IFN- γ dan MAF) yang berfungsi untuk mengaktifkan makrofag, sehingga makrofag aktif jumlahnya mengalami penurunan. Makrofag yang tidak aktif tidak akan mampu memfagosit sel kanker (Chodidjah, 2009 dan Mosser, 2003). Selain itu, penurunan aktivitas fagositosis makrofag juga disebabkan oleh beberapa hal, yaitu:

1. Estrogen mampu menghambat fungsi enzim yang membantu terbentuknya senyawa yang bersifat oksidatif kuat dan toksik bagi sel kanker seperti *nitric oxide* dan *reactive oxygen intermediate* yang membantu makrofag dalam proses fagositosis (Haniastuti, 2009).
2. Estrogen dapat menurunkan jumlah monosit, sehingga jumlah makrofag menurun. Monosit merupakan sel yang akan berdiferensiasi menjadi makrofag (Mosser, 2003).
3. Estrogen dapat merangsang apoptosis sel makrofag terutama yang memiliki reseptor estrogen β (RE β) dan estrogen tidak berpengaruh terhadap reseptor

estrogen α (RE α) pada makrofag (Gil Mor, 2003). Menurut Nurfaiziyah *et al.* (2011), kemampuan isoflavon untuk berikatan dengan RE β 20 kali lebih tinggi dibandingkan dengan RE α .

Estrogen dengan dosis tinggi (pada penelitian ini, dosis 3,2 g) dapat menurunkan aktivitas fagositosis makrofag juga sesuai dengan pernyataan Rasyid *et al.* (2008), bahwa pemberian estrogen peroral dengan konsentrasi tinggi dapat menurunkan aktivitas fagositosis makrofag.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian tepung tempe kedelai berpengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas fagositosis makrofag yang meliputi jumlah makrofag aktif dan jumlah *latex beads* yang difagosit oleh makrofag pada mencit C3H yang diinokulasi dengan sel *adenocarcinoma mammae*.
2. Rata-rata jumlah makrofag aktif, jumlah *latex* yang difagosit dan indeks fagositosis pada perlakuan yang diberi tepung tempe kedelai sebelum diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae* cenderung meningkat pada dosis 0,8 g, 1,6 g dan 2,4 g. Sedangkan pada dosis 3,2 g jumlah rata-ratanya mengalami penurunan.
3. Peningkatan rata-rata tertinggi pada aktivitas fagositosis makrofag terdapat pada dosis 2,4 g dengan jumlah makrofag aktif sebesar 95,33 per 100 sel makrofag, jumlah *latex beads* yang difagosit oleh makrofag sebesar 475,67 per 100 sel makrofag, serta indeks fagositosis makrofag sebesar 4,76.

5.2 Saran

Penelitian ini merupakan langkah awal dalam mengkaji potensi tepung tempe kedelai terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada mencit C3H yang diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*, sehingga untuk penelitian lebih lanjut perlu dilakukan pengujian aktivitas fagositosis makrofag pada mencit C3H dengan pemberian ekstrak tepung tempe kedelai dan aplikasi dilakukan secara bersamaan dengan inokulasi sel *adenocarcinoma mammae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A., Lichtman, A., and Pober, J.S. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Afiyata, N., Sarosa, H., dan Sumarawati, T. 2011. Pengaruh Tempe terhadap Kemampuan Fagositosis Makrofag : Studi Eksperimental pada Mencit Jantan Strain Balb/c. *Jurnal Medical Sain*. 3 (1): 54-62.
- Bambang. 2010. *Kejadian kanker payudara masih tertinggi*. <http://www.antaraneews.com/berita/1265254914/kejadian-kanker-payudara-masih-tertinggi>. Diakses pada 5 Desember 2014.
- Baratawidjaja, K.G. 2000. *Imunologi Dasar Edisi ke-5*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Baratawidjaja, K.G. dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar, Edisi 9*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- Batubara, L. 2006. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Umbi Daun Dewa (Gynura pseudochina) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit C3H yang Diinokulasi Sel Adenokarsinoma Mamma [Artikel Karya Tulis Ilmiah]*. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
- Bustan, M.N. 2007. *Epidemiologi Penyakit Tidak Menular*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Cassidy, A. Bingham, S., and Setchell, K. 1995. Biological Effects of Isoflavones in Young Women: Importance of the Chemical Composition of Soyabean Products. *British Journal of Nutrition*. 74: 587-601.
- Chodidjah. 2009. Aspek Immunologi pada Kanker Prostat. *Sultan Agung*. 44 (118): 1-14.
- Clarcke, L.H., Andrade, J.E., and Helferich, William. 2010. Is Soy Consumption Good or Bas for the Breast?. *Journal of Nutritio*. 140:2326S-2334S.
- Dickson, R.B., and Lippman, M.E. 1997. Cancer of the Breast. *Cancer: Principles and of Oncology*. 1542-1616.

- Difita, L. 2014. *Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Kombinasi Ekstrak Etanol Herba Meniran (Phyllanthus niruri L.), Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz. & Pav.), dan Umbi Keladi Tikus* [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.
- Efendi, Zukesti. 2003. *Daya Fagositosis Makrofag pada Jaringan Longgar Tubuh*. Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatra Utara.
- Fihiruddin. 2013. Pengaruh Pemberian Susu Kedelai terhadap Respon Antibodi dan Proliferasi Sel Limfosit pada Mencit Balb/C yang Diinduksi dengan Vaksin Hepatitis B. *Jurnal Media Bina Ilmiah*. 7 (5): 43-48.
- Gil Mor, Sapi, E. Abrahams, V.M., Rutherford, T., Song, J., Xiao, Muzaffar, S., and Kohen, F. 2003. Interaction of the Estrogen Receptors with the Fas Ligand Promoter in Human Monocytes. *Journal Immunology*. 170:114-122.
- Haniastuti, Tetiana. 2009. Penurunan Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag Mencit setelah Distimulasi Minyak Atsiri Kencur terhadap *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Dentika Dental Journal*. 14 (1) :11-14.
- Haryana, S. M., dan Soesatyo, M. 1995. Aspek Genetik dan Imunologik Kanker Payudara. *Cermin Dunia Kedokteran*. (99).
- Hondermarck, H. 2003. Breast Cancer: When Proteomics Challenges Biological Complexity. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2 (5): 281-291.
- Igney, F. and Krammer, P. 2002. Immune Escape of Tumors: Apoptosis Resistance and Tumor Counterattack. *Journal of Leukocyte Biology*. 71: 907-920.
- Kaczor, T., and Fabno. 2010. An Overview of Melatonin and Breast Cancer: Exploring Melatonin's Unique Effects on Breast Cancer Cell. *Natural Medicine Journal*. 2 (2).
- Khairinal. 2012. *Efek Kurkumin terhadap Proliferasi Sel Limfosit dari Limpa Mencit C3H Bertumor Payudara secara In Vitro* [Tesis]. Depok: Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- Koswara, S. 2006. *Isoflavon Senyawa Multi Manfaat Dalam Kedelai*. <http://www.ebookpangan.com>. Dikutip pada 3 Januari 2015.

- Kresno, S.B. 2003. *Aspek imunologi pada kanker: Simposium 4th Jakarta Antimicrobial Update 2003*. Jakarta: Sub Bagian Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia dan Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr Cipto Mangunkusumo.
- Kusmardi, Kumala, dan Wulandari. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag. *Makara Kesehatan*. 10 (2): 89-93.
- Lambert, K.C., Curran, E.M., Judy, B.M., Milligan, G.N., Lubahn, D.B., and Estes, Mark. 2015. Estrogen Receptor α (ER α) Deficiency in Macrophages Result in Increased Stimulation of CD4⁺ T Cells while 17 β -Estradiol Act through ER α to Increase IL-4 and GATA-3 Expression in CD4⁺ T Cells Independent of Antigen Presentation. *Journal Immunology*. 175:5716-5723.
- Lorsbach, R., Murphy, W., and Lowenstein, C. 1993. Expression of the Nitric Oxide Synthase Gene in Mouse Macrophages Activated for Tumor Cell Killing. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (3).
- Luwia, M. S. 2003. *Problematik dan Perawatan Payudara*. Jakarta: Kawan Pustaka.
- Mahriani dan Utami. 2014. Kajian Pemanfaatan Phytoestrogen dari Biji Kedelai untuk Pencegahan Kanker Payudara pada Mencit strain C3H. *Karya Ilmiah*. Jember: Universitas Jember.
- Maryanti, F. 2009. *Pengaruh Pemberian Seduhan Teh Hitam (Camellia sinensis) Dosis Bertingkat terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C yang Diinokulasi Salmonella typhimurium* [Laporan Tugas Akhir]. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
- Mense, S.M., Hei, T.K., Ganju, R.K., and Bhath, H.K. 2008. Phytoestrogens and Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factor, and Genetics. *BMJ*. 321: 624-628.
- Miladiyah, I. 2004. Isoflavon Kedelai sebagai Alternatif Terapi Sulih Hormon (TSH). *Jurnal Kedokteran YARSI*. Jakarta: Lembaga Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas YARSI.
- Mosser, David. 2003. The Many Faces of Macrophage Activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 73 (2): 209-212.

- Muryanto. 2007. *Pengaruh Kombinasi Transfer Factor – Cyclophosphamide terhadap Indeks Apoptosis dan Jumlah Makrofag pada Adenocarcinoma Mammariae Mencit C3H* [Tesis]. Semarang: Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Bedah, Universitas Diponegoro.
- Nurfaiziyah, A. 2011. Efek Pemberian Ekstrak Tempe Kedelai (*Glycine Max*) terhadap Ekspresi Caspase-3 Mencit Galur C3H Model Karsinogenesis Payudara. *Mandala of Health*. 5 (2).
- Pawiroharsono. 2001. *Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan*. Yogyakarta: Direktorat Teknologi Bioindustri Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Rasyid, R., Yanwirasti, dan Nasrul, Ellyza. 2008. Pengaruh Estrogen terhadap Aktifitas Sel Makrofag dalam Memfagosit *Candida albicans* secara In Vitro. *Majalah Kedokteran Andalas*. 32 (1): 79-87.
- Riyadi, F. 2008. *Efek Echinacea Terhadap Kemampuan Fagositosis dan Kadar Nitric Oxide (NO) Makrofag pada Adenokarsinoma Mammariae Mencit C3H yang Mengalami Stress* [Tesis]. Semarang: Magister Ilmu Biomedik dan Pendidikan Spesialis 1 Ilmu bedah, Universitas Diponegoro.
- Sabatier, C.V., Bignon, Y., and Bernard-Gallon, D.J. 2003. Effects of the Phytoestrogen Genistein and Daidzen on BRCA2 Tumor Suppressor Gene Expression in Breast Cell Lines. *Nutrition and Cancer*. 45 (2): 247-255.
- Safrida. 2008. *Perubahan Kadar Hormon Estrogen pada Tikus yang Diberi Tepung Kedelai dan Tepung Tempe* [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sudiana, Ketut. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika.
- Sugiyono. 2010. *Statistika untuk Penelitian*. Bandung: Alfabeta.
- Sukardja. 2000. *Onkologi Klinik Edisi 2*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Ujianto, A. 2010. *Jumlah Limfosit Darah Tepi dan Sebukan Limfosit Sekitar Jaringan Tumor pada Penderita Keganasan Payudara yang Mendapat Injeksi Vitamin C* [Tesis]. Semarang: Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Bedah, Universitas Diponegoro.
- Wahidah, N. 2010. *Efeter Spektivitas Suplementasi Mikromineral Seng (Zn) terhadap Indeks Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C yang Diinfeksi Salmonella Typhimurium* [Skripsi]. Semarang: Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang.

Winarto, D. 2009. *Pengaruh Pemberian Ketamin Dosis Induksi dan Analgesi terhadap Kapasitas Fagositosis Makrofag Intra Peritoneal Mencit Balb/C yang Terpapar Lipopolisakarida* [Laporan Tugas Akhir]. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.

Zhang, Y., Zhu, Y., Ren H., Sun J., and Wang, R. 2008. *Effects of Isoflavone Extract from Red Clover on Growth Performance and Immune Function in Mice. Journal-Shenyang Agricultural University*. 39 (1): 104



LAMPIRAN

A. Komposisi Pembuatan Media Kultur Lengkap

Tabel 3.1 Komposisi media kultur lengkap (MK)

No.	Bahan	Jumlah (%)	Jumlah (per 100 ml)
1.	Penisilin-Streptomisin	2 %	2 ml
2.	Fungizon	0,5 %	0,5 ml
3.	FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	10 %	10 ml
4.	Media (RPMI/DMEM)	Ad 100 %	Ad 100 ml

B. Penentuan Dosis

- LC₅₀ pada sel MCF-7 secara in vitro sebesar 208,31 µg/ml (Mahriani dan Utami, 2013).
- Hasil HPLC pada tepung tempe kedelai terdapat genistein sebesar 205,65 mg/kg berat kering (Safrida, 2008).

$$\text{Tepung tempe kedelai} = \frac{0,00020831 \text{ g/ml}}{0,00025065 \text{ g/ml}} = 0,8 \text{ g/ml}$$

- Jadi, 0,8 gram tepung tempe setara dengan dosis LC₅₀ pada sel MCF-7 secara in vitro.

Tabel 3.2 Pemberian Perlakuan Tepung Tempe pada Mencit C3H

LC ₅₀	Dosis	Volume Total	Volume Oral	Lama Pemberian
1	0,8 g	16 ml	1 ml/hari	16 hari
2	1,6 g	16 ml	1 ml/hari	16 hari
3	2,4 g	16 ml	1 ml/hari	16 hari
4	3,2 g	16 ml	1 ml/hari	16 hari

C. Hasil Uji Statistik *Oneway* ANOVA Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Makrofag Aktif

Descriptives

Makrofag_Aktif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	3	50.67	3.512	2.028	41.94	59.39	47	54
Kontrol Positif	3	66.67	8.505	4.910	45.54	87.79	58	75
Dosis 1	3	83.33	3.055	1.764	75.74	90.92	80	86
Dosis 2	3	91.00	7.810	4.509	71.60	110.40	82	96
Dosis 3	3	95.33	3.055	1.764	87.74	102.92	92	98
Dosis 4	3	87.67	1.155	.667	84.80	90.54	87	89
Total	18	79.11	16.645	3.923	70.83	87.39	47	98

ANOVA

Makrofag_Aktif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4378.444	5	875.689	31.715	.000
Within Groups	331.333	12	27.611		
Total	4709.778	17			

Makrofag_Aktif

Duncan

Dosis	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol Negatif	3	50.67			
Kontrol Positif	3		66.67		
Dosis 1	3			83.33	
Dosis 4	3			87.67	87.67
Dosis 2	3			91.00	91.00
Dosis 3	3				95.33
Sig.		1.000	1.000	.114	.114

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

D. Hasil Uji Statistik *Oneway* ANOVA Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Jumlah Latex Beads yang Difagosit oleh Makrofag

Descriptives

Jumlah_Latex

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	3	93.00	7.000	4.041	75.61	110.39	86	100
Kontrol Positif	3	147.00	62.746	36.226	-8.87	302.87	99	218
Dosis 1	3	249.33	13.650	7.881	215.42	283.24	237	264
Dosis 2	3	390.33	225.633	130.269	-170.17	950.84	201	640
Dosis 3	3	475.67	177.568	102.519	34.56	916.77	301	656
Dosis 4	3	276.00	41.617	24.028	172.62	379.38	250	324
Total	18	271.89	169.380	39.923	187.66	356.12	86	656

ANOVA

Jumlah_Latex

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	311035.778	5	62207.156	4.225	.019
Within Groups	176690.000	12	14724.167		
Total	487725.778	17			

Jumlah_Latex

Duncan

Dosis	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Negatif	3	93.00	
Kontrol Positif	3	147.00	
Dosis 1	3	249.33	249.33
Dosis 4	3	276.00	276.00
Dosis 2	3		390.33
Dosis 3	3		475.67
Sig.		.112	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

E. Hasil Uji Statistik *Oneway* ANOVA Pengaruh Tepung Tempe Kedelai terhadap Indeks Fagositosis Makrofag

Descriptives

Indeks_Fagositosis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	3	.9300	.07000	.04041	.7561	1.1039	.86	1.00
Kontrol Positif	3	1.4700	.62746	.36226	-.0887	3.0287	.99	2.18
Dosis 1	3	2.4933	.13650	.07881	2.1542	2.8324	2.37	2.64
Dosis 2	3	3.9033	2.25633	1.30269	-1.7017	9.5084	2.01	6.40
Dosis 3	3	4.7567	1.77568	1.02519	.3456	9.1677	3.01	6.56
Dosis 4	3	2.7600	.41617	.24028	1.7262	3.7938	2.50	3.24
Total	18	2.7189	1.69380	.39923	1.8766	3.5612	.86	6.56

ANOVA

Indeks_Fagositosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.104	5	6.221	4.225	.019
Within Groups	17.669	12	1.472		
Total	48.773	17			

Indeks_Fagositosis

Duncan

Dosis	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Negatif	3	.9300	
Kontrol Positif	3	1.4700	
Dosis 1	3	2.4933	2.4933
Dosis 4	3	2.7600	2.7600
Dosis 2	3		3.9033
Dosis 3	3		4.7567
Sig.		.112	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

