

II. TINJAUAN PUSTAKA

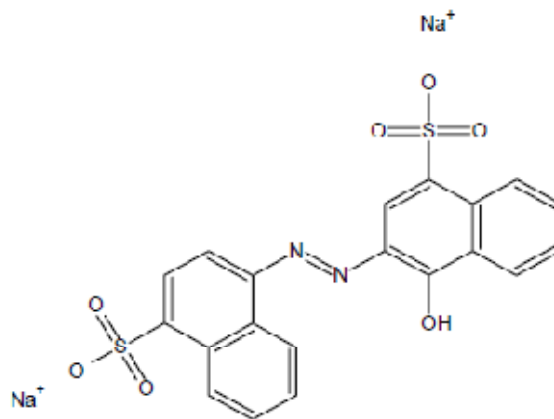
2.1. Toksisitas Pewarna Sintetis

Pewarna tambahan alami ataupun sintetis telah digunakan secara luas pada makanan, kosmetik dan obat-obatan (Hallagan *et al.* 1995). Walaupun demikian, menurut Thorngate III (2002) industri makanan lebih memilih pewarna sintetis dibandingkan pewarna asal hewan, tanaman ataupun mineral karena warnanya yang konsisten, kuat, dan stabil. Frazier (2009) menyebutkan bahwa pewarna sintetis umumnya berupa pewarna azo (seperti karmoisin, amaranth), yang warnanya berasal dari grup azo (-N=N-R2). Grup R pada pewarna azo secara normal merupakan sistem aromatik, memberikan sistem ikatan ganda terkonjugasi yang dapat menampilkan berbagai jenis warna (kuning, oranye, merah, coklat).

Toksikologi pewarna makanan sintetis kurang mendapat perhatian hingga awal dekade 1930, ketika *4-dimethylaminoazobenzene* ditemukan bersifat karsinogen. Setelah itu, pewarna-pewarna lain terbukti bersifat toksik dan dilarang untuk ditambahkan pada makanan (Janssen 1997). Walaupun demikian, pewarna sintetis yang dilarang masih sering digunakan dan ditemukan keberadaannya dalam makanan. Menurut EFSA (2005), banyak negara Uni Eropa memberikan notifikasi tentang keberadaan pewarna-pewarna ilegal yang diketahui memiliki sifat karsinogenik dan genotoksik seperti Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV, Para Red, Rhodamin B, and Orange II pada beberapa jenis makanan.

2.1.1. Karmoisin

Karmoisin atau dikenal juga dengan *azorubine* merupakan pewarna azo dengan rumus kimia $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$ (Gambar 1). Senyawa ini memiliki berat molekul 502.44 g/mol dengan nama kimia *disodium 4-hydroxy-3-(4-sulphonato-1-naphthylazo) naphthalene-1-sulphonate* (EFSA 2009). Karmoisin bersifat larut air dan sedikit larut pada etanol. Senyawa ini biasanya berbentuk bubuk garam disodium dengan warna merah hingga *maroon*. Karmoisin umum digunakan pada makanan yang mengalami proses pemanasan setelah difermentasi (Amin *et al.* 2010).



Gambar 1. Struktur kimia Karmoisine (EFSA 2009)

Hingga saat ini, Karmoisin merupakan pewarna makanan sintetis yang diizinkan di Uni Eropa dengan level maksimal penggunaan yang diizinkan sebesar 50-500 mg/kg pangan untuk berbagai jenis

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

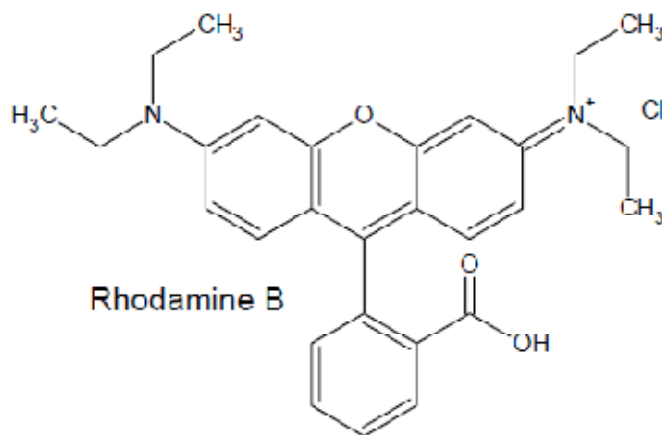
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

bahan pangan dengan nilai *Acceptable Daily Intake* (ADI) sebesar 0-4 mg/kg BB/hari. Sebagian dari karmoisin yang dicerna mengalami reduksi azo dalam usus. Selain itu, karmoisin yang tidak termodifikasi dan 5 metabolit tidak dikenal juga ditemukan pada feses (EFSA 2009). Menurut Amin *et al.* (2010), karmoisin dapat tereduksi dalam organisme menjadi sebuah amine aromatik yang sangat sensitif.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan efek negatif dari karmoisin. Studi yang dilakukan oleh Amin *et al.* (2010) menyimpulkan bahwa pewarna makanan seperti tartrazin dan karmoisin dapat memberikan pengaruh negatif dan mengubah beberapa penanda biokimia pada organ-organ penting seperti hati dan ginjal, baik pada dosis tinggi ataupun rendah. Lebih jauh lagi, tartrazin dan karmoisin juga memberikan efek yang lebih beresiko pada dosis yang lebih tinggi karena dapat menginduksi stress oksidatif melalui pembentukan radikal bebas. Sharma *et al.* (2006) menemukan bahwa dua dosis *Tomato Red* (campuran karmoisin dan ponceau 4R) menunjukkan peningkatan yang signifikan pada aktivitas *alkaline phosphatase* (ALP). Pada keadaan normal, ALP yang berada di dalam hati akan diekskresikan ke dalam empedu. Jika terjadi kerusakan atau obstruksi pada hati dan saluran empedu, seperti kolestasis, maka kadar ALP darah akan meningkat. Selain itu, Sharma *et al.* (2005) juga mengamati adanya peningkatan yang signifikan pada serum transaminase, total protein serum dan globulin tikus yang dietnya ditambahkan pewarna coklat A dan B (*Sunset Yellow*, tartrazin, karmoisin dan *Brilliant Blue* pada berbagai konsentrasi). Peningkatan spesifik pada fraksi globulin ini menuju kepada peningkatan sintesis immunoglobulin, mekanisme pertahanan yang bertujuan untuk melindungi tubuh dari efek toksik pewarna sintesis tersebut.

1.2. Rhodamin B

Rhodamin B (C₂₈H₃₁ClN₂O₃) adalah zat warna sintetis berbentuk serbuk kristal, berwarna jingga atau ungu kemerahan, tidak berbau dan berwarna merah terang berfluorensi dalam larutan. Rhodamin B memiliki nama kimia *[9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-diethylammoniumchloride* dengan berat molekul 479.02 g/mol. Rhodamin B semula digunakan untuk kegiatan histologi dan sekarang berkembang untuk berbagai keperluan seperti sebagai pewarna kertas dan tekstil. Rhodamin B juga digunakan secara luas pada aplikasi bioteknologi seperti *fluorescence microscopy*, *flow cytometry*, *fluorescence correlation spectroscopy* dan ELISA. Menurut Inchem (2006) nilai LD₅₀ rhodamin B adalah 89.5 mg/kg berat badan.



Gambar 2. Struktur kimia Rhodamine B (EFSA 2005)

Rhodamin B seringkali disalahgunakan untuk pewarna pangan dan kosmetik. Sebagai contoh, rhodamin B ditemukan pada makanan dan minuman seperti kerupuk, sambal botol dan sirup di Makassar pada saat BPOM Makassar melakukan pemeriksaan sejumlah sampel makanan dan minuman ringan (Anonimus 2006). Menurut Peraturan Menteri Perdagangan RI No.4 tahun 2006, rhodamin B termasuk dalam bahan pewarna sintetis yang dilarang penggunaannya (Tabel 1).

Tabel 1. Bahan pewarna sintetis yang dilarang penggunaannya pada makanan di Indonesia

No	Nama	Warna
1	Merah	Citrus Red
2	Merah	Ponceau 3R
3	Merah	Ponceau SX
4	Merah	Sudan I
5	Merah	Rhodamin B
6	Merah	Amaran
7	Merah	Ponceau 6R
8	Oranye	Auramine
9	Oranye	Chrycidine
10	Oranye	Oil Orange SS
11	Oranye	Oil Orange XO
12	Oranye	Orange G
13	Oranye	Orange GGN
14	Kuning	Oil Yellow AB
15	Kuning	Oil Yellow OB
16	Kuning	Methanil Yellow
17	Kuning	Butter Yellow
18	Kuning	Aniline Yellow
19	Hijau	Guinea Green
20	Biru	Indantren Blue R
21	Violet	Magenta I
22	Violet	Magenta II
23	Violet	Magenta III
24	Violet	Violet 6B
25	Coklat	Coklat FB

Berdasarkan data dari berbagai studi yang telah dilakukan, EFSA (2005) menyimpulkan bahwa rhodamin B berpotensi memiliki sifat karsinogenik dan genotoksik. Kaji *et al.* (1991) melakukan pengujian terhadap efek pewarna kosmetik rhodamin B terhadap proliferasi fibroblast (sel D) bibir manusia pada sistem kultur dan menemukan bahwa rhodamin B, pada konsentrasi 25 µg/ml dan konsentrasi yang lebih tinggi, secara signifikan menurunkan jumlah sel setelah dikultur selama 72 jam. Menurut Pipih dan Juli (2000) pemberian dosis rhodamin B 150 ppm, 300 ppm, dan 600 ppm

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

pada mencit menunjukkan terjadinya perubahan bentuk dan organisasi sel dalam jaringan hati dari normal ke patologis, yaitu perubahan sel hati menjadi nekrosis dan jaringan di sekitarnya mengalami desintegrasi atau disorganisasi. Kerusakan pada jaringan hati ditandai dengan terjadinya piknotik dan hiperkromatik dari nukleus, degenerasi lemak dan sitolisis dari sitoplasma.

2.2. Jelatang (*Urtica dioica* L.)

Jelatang (*Urtica dioica* L.) merupakan spesies yang paling banyak dikenal dari 30-45 tanaman dalam genus *Urtica*. Tanaman yang umum disebut *common nettle* atau *stinging nettle* ini merupakan tanaman asli Eropa, Asia, bagian utara Afrika, dan Amerika Utara. Tanaman ini sering dihindari karena adanya bulu atau duri-duri halus pada daun dan batangnya. Jika menyentuh kulit, duri-duri halus ini akan mengeluarkan beberapa komponen kimia seperti *acetylcholine*, histamin, serotonin dan dalam format yang kemungkinan menimbulkan rasa gatal.

Berikut adalah klasifikasi *Urtica dioica* L.

Kingdom :	Plantae
Subkingdom :	Tracheobionta
Superdivisi :	Spermatophyta
Divisi :	Magnoliophyta
Kelas :	Magnoliopsida
Subkelas :	Hamamelididae
Ordo :	Urticales
Famili :	Urticaceae
Genus :	<i>Urtica</i> L.
Spesies :	<i>Urtica dioica</i> L.

(European Medicines Agency 2007)

Jelatang berkembang biak dengan menyebarkan rhizome dan stolon hingga membentuk rumpun. Tanaman perennial (tahunan) ini mampu tumbuh hingga mencapai tinggi 1-2 meter. Daun, batang dan kelopak tanaman jelatang dipenuhi duri atau bulu-bulu halus yang dapat menimbulkan rasa gatal dan menyengat jika menyentuh kulit. Daun tanaman jelatang berbentuk lancip dan bergerigi. Tanaman ini memiliki bunga yang berwarna putih kekuningan. Tanaman jelatang mampu menghasilkan 10.000 hingga 20.000 biji pada cuaca cerah. Penampakan tanaman jelatang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Jelatang (*Urtica dioica* L.)
(American Herbal Pharmacopoeia 2009)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Secara tradisional, tanaman jelatang banyak digunakan sebagai obat dan bahan makanan. Daun jelatang memiliki rasa seperti bayam dan umum dimasak menjadi sup walaupun pengolahan menjadi minuman sejenis teh juga kerap ditemui. Perendaman dalam air atau pemasakan, secara tradisional diyakini dapat menghilangkan efek gatal atau menyengat dari tanaman ini sehingga aman dikonsumsi. Menurut Allardice (1993), jelatang merupakan pangan yang sangat bergizi yang mudah dicerna dan kaya akan mineral (terutama zat besi), vitamin C dan provitamin A. Daun jelatang mengandung sekitar 14.4 mg/100 g α -tocopherol, 0.23 mg/100 g riboflavin, 13 mg/100 g Fe, 0.95 mg/100 g Zn, 873 mg/100 g Ca, dan 532 mg/100 g K (Aksu dan Kaya 2004). Guil-Guerrero *et al.* (2003) juga mengidentifikasi adanya kandungan karotenoid pada daun jelatang, diantaranya lutein dan isomernya yaitu β -karoten dan isomernya dengan kandungan vitamin A untuk setiap 100 g daun jelatang muda dan tua masing-masing 16.2 dan 36,2 μ g RE. Tanaman jelatang juga dikembangkan secara komersial untuk ekstraksi klorofil yang digunakan sebagai pewarna makanan dan obat-obatan. Beberapa komponen aktif telah berhasil diisolasi dari beberapa bagian tanaman jelatang; steroid, *phenylpropanoid*, coumarin (Chaurasia dan Wichtl 1987), terpenoid (Ganser dan Spiteller 1995), polisakarida (Wagner *et al.* 1989) dan lektin (Galelli and Truffa-Bachi 1993) dari akar. Karakaya dan Kaya (1999) mendeteksi kandungan flavonoid pada jelatang dengan apigenin sebagai komponen flavonoid utama.

Daun jelatang digunakan secara tradisional sebagai obat herbal untuk perawatan radang sendi (*arthritis*). Ekstrak dari tanaman ini juga sering digunakan sebagai obat alami untuk hipertensi dan diabetes (Ziyyat *et al.* 1997). Frago et al. (2008) menyebutkan penggunaan jelatang sebagai obat tradisional pada beberapa penyakit seperti penyakit kelamin dan saluran kencing yang ringan (*hematuria, dysuria*, penghambatan saluran ginjal, iritasi kantung kemih, dan infeksi), gangguan ginjal, alergi, diabetes, pendarahan internal (mencakup pendarahan *uterine*, epistaxis, dan melena), anemia, penyakit saluran pencernaan yang ringan (diare, disentri, dan keasaman lambung yang meningkat), sakit muskuloskeletal, *osteoarthritis*, dan *alopecia*.

Beberapa temuan menunjukkan bahwa tanaman jelatang memberikan efek positif terhadap sistem imun tubuh. Komponen flavonoid glikosida utama yang diisolasi dari tanaman jelatang diketahui memiliki aktivitas immunomodulator dan anti-inflamasi (Akbay *et al.* 2003). Ekstrak biji tanaman jelatang memiliki efek *hepatoprotective* pada tikus yang menderita *aflatoxicosis*, yang kemungkinan bekerja dengan meningkatkan sistem pertahanan antioksidatif (Yener *et al.* 2009). Polisakarida yang diisolasi dari ekstrak air akar tanaman jelatang mampu menstimulasi baik sel T limfosit ataupun sistem pelengkap secara *in vitro* (Wagner *et al.* 1989). Gulcin *et al.* (2004) menunjukkan bahwa tanaman jelatang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

3. Limfosit

Limfosit merupakan bagian dari sel darah putih (*leucocytes*) yang tidak memiliki granula dalam sitoplasma (Kuby *et al.* 2007). Limfosit terdapat sebanyak 20-80% dari sel bernukleasi dalam darah dan lebih dari 99% dalam cairan limfatik (limfa). Limfosit juga terdapat dalam organ limfoid termasuk limfa, kelenjar limfa dan timus. Limfosit merupakan bagian dari sel darah putih yang bersifat agranulosit, berukuran kecil, berbentuk bulat dengan diameter 7-12 μ m. Limfosit merupakan kunci dalam proses imun spesifik (meliputi respon imun seluler dan humoral) untuk mengenali antigen melalui reseptor antigen.

Menurut Roitt & Delves (2001) limfosit mempunyai reseptor antigen yang beragam tetapi setiap limfosit hanya dapat mengenal satu antigen. Berdasarkan fungsinya, sel limfosit dibagi menjadi

tiga kelompok yaitu limfosit sel B, sel T, dan sel NK (*Natural Killer*). Sel B dan T memiliki reseptor pada permukaan yang mampu mengenali antigen tertentu dan termasuk dalam sistem pertahanan spesifik sedangkan sel NK tidak mempunyai reseptor untuk mengenal antigen termasuk sistem pertahanan non spesifik (Kuby *et al.* 2007). Pada manusia normal, sel limfosit B berjumlah 5-15% dan sel limfosit T berjumlah sekitar 65-80% dari jumlah limfosit dalam tubuh. Sel B berperran dalam respon imun humoral dan sel T berperan dalam sistem imun seluler, sedangkan sel *Natural Killer* berperan dalam respon imun non spesifik (Harris 1991).

Sel limfosit B merupakan sel yang berasal dari sel stem dalam sumsum tulang belakang, tumbuh menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi dan sel memori. Reseptor sel B merupakan molekul antibodi terikat membran. Menurut Sheeler dan Bianchi (1982) limfosit B termasuk sistem pertahanan humoral yaitu tidak menggunakan sel dalam melawan antigen melainkan menghasilkan berbagai jenis antibodi. Sel B memori memiliki waktu hidup lebih lama dan terus mengekspresikan antibodi terikat membrannya. Meskipun sel plasma hanya hidup beberapa hari, namun sel-sel ini dapat mensekresikan antibodi dalam jumlah besar selama hidup. Diperkirakan bahwa satu sel plasma dapat mensekresikan lebih dari 2000 molekul antibodi per detik. Antibodi yang disekresi merupakan molekul efektor yang penting dalam imunitas humoral.

Sel limfosit T merupakan sistem pertahanan seluler yang berasal dari sel stem (sumsum tulang belakang) dan bermigrasi ke organ timus untuk menjadi dewasa. Sel T dewasa meninggalkan kelenjar timus dan masuk ke dalam pembuluh getah bening dan berfungsi sebagai bagian dari sistem pengawasan kekebalan. Dalam proses pendewasaan, sel T membelah diri menjadi tiga bentuk yang memiliki peran masing-masing yaitu sel *Thelper* (Th), *Tsuppresor* (Ts) dan *Tcytotoxic* (Tc). Sel *Thelper* dapat dibedakan dari sel *Tcytotoxic* pada adanya glikoprotein yang berbeda pada permukaan membran mereka. Sel *Thelper* merupakan sel T yang berperan dalam stimulasi sistesis antibodi dan aktivasi makrofag dengan cara mengeluarkan molekul yang disebut sitokinin. Sel ini bekerja bersama dengan aktivitas antibodi sel B. Sel *Tsuppresor* berperan menekan aktivitas sel T yang lain. Sel ini mempunyai kemampuan menurunkan produksi antibodi. Sel *Tcytotoxic* memiliki kemampuan untuk menghancurkan sel alogenik dan sel sasaran yang terinfeksi patogen intraseluler (Baratawidjaja 2006).

Adapun sel NK menurut Kresno (1996) termasuk sel nul karena tidak memiliki reseptor antigen pada permukaan tetapi memiliki reseptor untuk komplemen (C) dan fragmen molekul antibodi. Sel ini memiliki ukuran yang lebih besar daripada limfosit T dan B. Sel limfosit ini juga dikenal sebagai *Large Granular Lymphocyte* (LGL) karena merupakan sel dengan sejumlah besar sitoplasma dengan granula azurofilik (Kuby *et al.* 2007). Sel NK berfungsi sebagai sel efektor sitolitik yang dapat menyerang dan melisis sel target yaitu sel abnormal seperti sel neoplastik, sel terinfeksi virus /patogen seluler, dan sel normal yang tidak dewasa (Roitt dan Delves 2001).

4. Proliferasi Sel Limfosit

Proliferasi merupakan fungsi fisiologis yaitu proses pembelahan secara mitosis dan diferensiasi sel sebagai respon terhadap antigen atau mitogen (Zakaria *et al.* 2003). Proliferasi limfosit dapat mengindikasikan aktivitas respon imun spesifik yang berkaitan dengan suatu sistem imun. Sel limfosit yang dapat berproliferasi adalah bagian dari sel limfosit yang memiliki peranan dalam sistem imun spesifik yaitu sel B dan sel T. Sel T akan menghasilkan sitokin yang menginduksi sistem imun yang lain, sedangkan sel B akan menghasilkan antibodi dari sel plasmanya untuk melawan benda asing (antigen) yang dapat merugikan kesehatan (Kuby *et al.* 2007). Adanya proliferasi akan memperbanyak jumlah sel B dan sel T sehingga kemampuan menghasilkan sitokin dan antibodi yang diperlukan untuk melawan antigen meningkat dan pertahanan tubuh (sistem imun) pun meningkat.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Respon proliferasi sel limfosit yang di uji pada sistem in vitro dapat digunakan untuk menggambarkan fungsi limfosit dan status imun individu. Proliferasi merupakan fungsi biologis mendasar pada sel limfosit, yaitu meliputi proses diferensiasi dan pembelahan sel. Aktivitas proliferasi limfosit merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengukur status imunitas karena proses proliferasi menunjukkan kemampuan dasar dari sistem imun (Roitt dan Delves 2001).

Proliferasi sel limfosit dapat diinduksi oleh suatu senyawa yang disebut mitogen. Mitogen pada umumnya berasal dari tumbuhan (lektin) atau merupakan gula terikat seperti concanavalin A (con-A), *Phaseolus moutanensis* (PWM) dan fitohemagglutinin (PHA) serta senyawa non lektin seperti lipopolisakarida (LPS). Menurut Lao *et al.* (2001) aktivitas mitogen bersifat spesifik seperti con-A umumnya menginduksi proliferasi sel limfosit T, LPS menginduksi sel B, sedangkan PWM menginduksi sel limfosit T dan B. Kresno (1996) menyatakan bahwa respon terhadap mitogen dianggap menyerupai respon limfosit terhadap antigen, sehingga uji proliferasi limfosit dengan rangsangan mitogen banyak dipakai untuk menguji fungsi limfosit.

5. Uji Proliferasi Sel Limfosit

Pengujian aktivitas proliferasi sel limfosit dapat dilakukan secara in vivo pada tikus percobaan dengan tujuh minggu masa perlakuan. Pengujian ini meliputi proses isolasi sel limfosit, perhitungan dan pengkulturan suspensi sel limfosit limfa. Sel limfosit yang umum digunakan adalah sel limfosit dari organ limfa. Organ limfa merupakan organ limfoid sekunder yang berfungsi menangkap dan mempresentasikan antigen dengan efektif. Selain itu, sel B dan sel T dalam organ limfa sudah dalam keadaan matang dan siap untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. Organ limfa juga merupakan tempat untuk saringan darah atau pembersihan mikroba darah dan tempat respon imun utama terhadap antigen asal darah (Baratawidjaja 2006).

Perhitungan jumlah sel hidup dilakukan dengan metode pewarnaan biru trifan. Biru trifan merupakan larutan buffer isotonik. Prinsip metode ini adalah penyerapan zat warna melalui membran sel. Biru trifan hanya dapat mewarnai sel jika sel itu rusak sehingga dapat digunakan untuk membedakan sel mati/rusak dengan sel hidup. Sel hidup memiliki bentuk bulat dan tidak berwarna/terang, sedangkan sel mati/rusak memiliki bentuk mengkerut dan berwarna biru (Shaper 1998).

2.5.1. Kultur Sel

Kultur sel merupakan teknik yang biasa digunakan untuk mengembangbiakkan sel di luar tubuh (in vitro). Kultur sel dapat digunakan untuk mengevaluasi dampak yang ditimbulkan dari kondisi abnormal atau keberadaan senyawa berbahaya pada sel. Untuk melakukan kultur sel secara in vitro dibutuhkan kondisi pertumbuhan yang mirip dengan kondisi in vivo seperti pengaturan temperature, konsentrasi O₂ dan CO₂, pH, tekanan osmosis, dan kandungan nutrisi. Dalam bidang ilmu pangan, kultur sel seringkali digunakan untuk evaluasi fungsi dan keamanan bahan pangan secara in vitro (Freshney 1994).

Doyle dan Griffiths (1997) menyatakan kultur sel limfosit secara in vitro merupakan suatu cara untuk mengembangbiakkan atau menumbuhkan sel limfosit di luar tubuh hewan atau manusia. Rangsangan dan nutrisi untuk pertumbuhan sel secara in vitro diusahakan menyerupai keadaan sel secara in vivo. Oleh karena itu diperlukan media pertumbuhan yang mampu mempertahankan PH dan menyediakan lingkungan yang baik serta menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, glukosa dan serum. Media pertumbuhan yang

digunakan harus disesuaikan dengan jenis sel yang akan dikultur. Media yang sering digunakan untuk kultur sel limfosit adalah *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640* yang merupakan media sintesis yang kaya nutrisi.

Serum yang biasa digunakan untuk kultur sel limfosit adalah *Fetal Bovine Serum (FBS)*. Serum ini berfungsi sebagai protein pembawa hormon untuk menstimulasi pertumbuhan sel. Komponen serum sebagian besar adalah protein dan komponen lainnya seperti polipeptida, hormon-hormon, mineral dan bahan makanan seperti asam amino, glukosa, lemak, asam keto, etoalamin, fosfoetanol amin dan hasil-hasil metabolit lainnya.

Media kultur sel juga ditambahkan *buffer* dan antibiotik. Penambahan *buffer* bertujuan untuk menjaga keseimbangan nilai pH yaitu pH 7.4. Menurut Freshney (1994) pertumbuhan sel akan terhambat jika pH sedikit lebih rendah dari pH 7. *Buffer* yang umum digunakan adalah NaHCO_3 . Penambahan antibiotik bertujuan untuk mencegah kontaminasi media. Antibiotik yang berbeda memiliki spektrum antimikroba yang berbeda. Penisilin merupakan antimikroba untuk bakteri gram positif, streptomisin untuk bakteri gram positif dan negatif, sedangkan gentamisin untuk bakteri gram negatif, gram negatif, dan mikroplasma (Freshney 1994). Menurut Cartwright dan Shah (1994) faktor utama dalam memilih jenis antibiotik untuk kultur sel adalah tidak bersifat toksik, memiliki spektrum antimikroba yang luas, ekonomis, dan memiliki kecenderungan minimum untuk menginduksi pembentukan mikroba yang kebal. Antibiotik yang sering digunakan adalah campuran penisilin dan streptomisin.

Menurut Freshney (1994) penggunaan kultur sel lebih menguntungkan karena lingkungan tempat hidup sel dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan. Namun teknik ini juga memiliki beberapa kelemahan seperti rawan kontaminasi karena sel hewan tumbuh lebih lambat daripada kontaminan, membutuhkan lingkungan yang kompleks seperti di dalam tubuh, serta sel yang tumbuh mengalami perubahan sifat dan kehilangan spesifitas sel karena sel tidak terintegrasi dalam jaringan.

2.5.2. Uji MTT

Pengujian proliferasi sel dapat dilakukan menggunakan metode pewarnaan MTT (*3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). MTT merupakan suatu garam tetrazolium yang direduksi pada sel metabolik hidup. Prinsip metode ini adalah pengukuran absorbansi senyawa formazan yang berwarna ungu yang merupakan hasil konversi MTT oleh aktivitas enzim suksinat dehidrogenase dari mitokondria sel hidup. Kandungan suksinat dehidrogenase relatif konstan diantara berbagai sel dengan tipe spesifik, sehingga jumlah formazan yang terbentuk proporsional terhadap jumlah sel limfosit yang hidup. Bagaimanapun, telah diketahui juga bahwa reliabilitas dan sensitivitas metode ini dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya volume sel, antioksidan dan senyawa berwarna lainnya (Wang *et al.* 2006).

Enzim suksinat dehidrogenase adalah salah satu enzim yang berperan aktif selama proses respirasi seluler secara aerobik. Enzim suksinat dehidrogenase merupakan flavoprotein yang mengandung protein dengan ikatan Fe (besi) dan S (belerang). Enzim ini terikat pada bagian membran mitokondria yang berfungsi sebagai reduktor selama tahapan siklus Krebs dan transport elektron. Pada siklus Krebs, enzim ini menerima hidrogen dari suksinat dan bertugas menghidrogenasi suksinat menjadi fumarat serta menghasilkan FADH_2 (Lehninger 1982).

Freimoser *et al.* (1999) menyatakan bahwa MTT *assay* merupakan metode uji viabilitas sel kuantitatif yang lebih praktis, cepat dan efisien dengan hasil yang cukup akurat dibandingkan dengan menggunakan metode pewarnaan biru tripan yang dilakukan secara manual pada pengujian sel fungsi. Reduksi garam tetrazolium merupakan cara yang dapat dipercaya untuk mendeterminasi proliferasi sel



limfosit. Garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning berkurang sebagai akibat proses metabolisme sel, terutama karena aktivitas kerja enzim suksinat dehidrogenase. Kristal formazan tidak larut air berwarna biru tua yang terbentuk dapat dilarutkan dengan pelarut organik seperti isopropanol, etil asetat, dietil eter atau n-butanol dan kemudian diukur absorbansinya dengan *spectrophotometer microplate reader*.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.