

TESIS

PENGARUH PAPARAN BENZOPIRIN TERHADAP PENURUNAN RESPONS IMUN MUKOSA ILEUM MENCIT (*Mus musculus L*)

Pendekatan Patobiologik



SAIKHU AKHMAD HUSEN

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

**PENGARUH PAPARAN BENZOPIRIN
TERHADAP PENURUNAN RESPONS
IMUN MUKOSA ILEUM MENCIT
(*Mus musculus L*)**

Pendekatan Patobiologik



TESIS

**Untuk memperoleh gelar Magister Kesehatan
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**SAIKHU AKHMAD HUSEN
NIM. 099712496M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

LEMBAR PENGESAHAN

**Tesis Ini Telah Disetujui
Tanggal 25 Pebruari 2000**

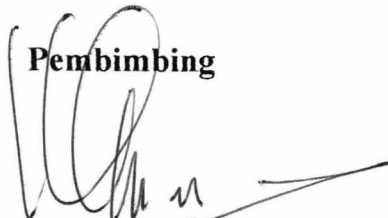
Oleh

Pembimbing Ketua



**Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr, MS, Sp PA, FIAC.
NIP. 130517159**

Pembimbing



**Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS.
NIP. 130934628**

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Soetjipto, dr, MS, Ph D.
NIP. 130687606**

**Tesis Telah Diuji Pada
Tanggal 14 Pebruari 2000**

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. H.A. Soeparmo, MS.

**Anggota : 1. Dr. H. Sarmanu, drh, MS
2. Dr. I Ketut Suidiana, M Kes
3. Dr. Suhartono Taat Putra, dr,MS.
4. Prof. Dr. Juliati Hood A.dr,MS,Sp PA,FIAC.**

Tidak sepatutnya bagi orang-orang mukmin itu pergi semuanya
(ke medan perang)

Mengapa tidak pergi dari tiap-tiap golongan di antara mereka,
beberapa orang untuk memperdalam ilmu pengetahuan mereka
tentang agama dan untuk memberi peringatan bagi kaumnya,
apabila mereka telah kembali kepadanya supaya mereka itu
dapat menjaga dirinya (QS. At Taubah : 122).

Pelajarilah Ilmu, maka mempelajarinya karena Allah itu
taqwa, menuntutnya itu ibadah, mengulang ulangnya itu
tasbih, membahasnya itu jihad, mengajarkannya kepada
yang belum tahu itu sedekah, memberikan kepada ahlinya
itu mendekatkan diri kepada Allah. (Al Ghazali,
Ihya' Ulumuddin).

Kupersembahkan Tesis ini Kepada :
**Almamater tercinta Universitas Airlangga,
Kedua orang tuaku, Bapak dan ibu guruku,
Istri dan Anak anaku.**

RINGKASAN

Penelitian mengenai “Pengaruh Paparan Benzopirin Terhadap Penurunan Respons Imun Mukosa Ileum Mencit (*Mus musculus* L)” ini, bertujuan untuk menjelaskan penurunan komponen sel imunokompeten, yang menyebabkan penurunan respons imun pada mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin pada dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi ilmiah, dalam mencegah paparan benzopirin lebih lanjut, untuk menghindari terjadinya peningkatan karsinogenesis dan terjadinya kanker usus, berdasarkan paradigma patobiologik yang berkonsep imunopatobiologik dan pemeriksaan variabel secara morfofungsi.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental sesungguhnya, menggunakan rancangan faktorial dengan faktor dosis dan waktu paparan benzopirin yang berbeda yang dilakukan pada mencit jantan. Operasionalisasi penelitian ini menggunakan 3 kelompok dosis yang berbeda yaitu kelompok kontrol (0 mg/kg berat badan), perlakuan I (10 mg/kg berat badan) dan perlakuan II (20 mg/kg berat badan). Setiap kelompok dosis dibagi lagi menjadi 4 kelompok waktu paparan yang berbeda yaitu paparan 1, 2, 4 dan 8 minggu. Data diperoleh dari hasil pembacaan dan penghitungan jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif per lapang pandang, pada sediaan histopatologik mukosa ileum mencit yang mengandung *Peyer's patch* . Data yang diperoleh dilakukan analisis data dengan menggunakan analisis varians 2 arah yang dilanjutkan dengan uji t.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk variabel jumlah limfosit secara keseluruhan, faktor dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan benzopirin, berbeda secara bermakna. Untuk variabel jumlah makrofag, faktor dosis tidak berbeda secara bermakna, sedangkan faktor waktu serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan berbeda secara bermakna.

Variabel jumlah sel plasma aktif, faktor waktu tidak berbeda secara bermakna, sedangkan faktor dosis serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda, berbeda secara bermakna.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda berpengaruh terhadap penurunan jumlah limfosit pada mukosa ileum menciit; paparan benzopirin dengan: (a) dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap penurunan jumlah makrofag pada mukosa ileum menciit, (b) waktu paparan yang berbeda serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda berpengaruh terhadap penurunan jumlah makrofag pada mukosa ileum menciit; paparan benzopirin dengan : (a) dosis yang berbeda berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum menciit, (b) waktu paparan yang berbeda tidak berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum menciit, (c) kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel plasma aktif mukosa ileum menciit.

Dalam upaya mengungkap imunopatogenesis di mukosa ileum menciit akibat paparan benzopirin yang dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kanker usus, untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemeriksaan variabel respons imun seluler, yang meliputi makrofag, CD4, CD8, sel NK serta sitokin dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia.

ABSTRACT

The influence of benzopyrene exposure on the decrease of mucosal immune response in ileum of mice was studied to demonstrate the reduction of immunocompetent cell components that may decrease mucosal immune response in the ileum of mice exposure benzopyrene in different dose, exposure period and combination of dose and exposure period. This study used 36 mice, which were divided into three dose group (0, 10, and 20 mg/kg BW). Each dose group was subdivided into 4 different period groups (1, 2, 4 and 8 weeks). In control group, olivarium oil was given orally to each mice, while in the treatment groups, benzopyrene solution of 10 mg/kg BW (P1) and 20 mg/kg BW (P2) as much as 0,2 ml was given orally to each mice during the determinant periods. Results showed that variables of lymphocyte, dose factor, exposure period and combination of dose and exposure period were significantly different. Variables of macrophage, dose factor were not significantly different, while period factor and combination of period and dose were significantly different. Variables of active plasma cells, period factor were not significantly different, while dose factor and combination of dose and periode were significantly different.

Keywords: benzo(a)pyrene , mocosal immune response, immunosuppressive, lymphocyte, macrophage, active plasma cells.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Alhamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena hanya berkat rahmat dan hidayahNya saya mampu menyelesaikan seluruh kegiatan penelitian serta penulisan tesis ini. Dalam kesempatan ini saya ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak, baik lembaga maupun perorangan yang telah membantu saya dalam menyelesaikan penyusunan tesis ini, ucapan terima kasih yang sebesar besarnya khususnya saya tujukan kepada.

1. Rektor Universitas Airlangga, Direktur Program Pascasarjana dan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang telah menerima dan memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program magister di Program Pascasarjana Universitas Airlangga,
2. Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaf, dr, MS, Sp PA, FIAC., selaku guru saya dan pembimbing ketua yang telah banyak membantu dalam pengarahan dan tambahan wawasan keilmuan serta membantu mengatasi segala hambatan selama pelaksanaan penelitian ini,
3. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS, selaku guru saya dan pembimbing yang telah banyak memberikan pengarahan dan tambahan wawasan keilmuan, khususnya imunopatobiologi mukosal, saya sangat berhutang budi kepadanya atas waktu yang diberikan kepada saya untuk membimbing, mengoreksi serta memberikan saran dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini,

4. Prof. H.A.Soeparmo,MS., selaku ketua penguji tesis sekaligus guru saya dan guru besar Biologi FMIPA Universitas Airlangga, yang telah memberikan motivasi kepada saya untuk mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga,
5. Dr. Soegeng Soekamto, dr,MS., selaku guru saya dan konsultan dalam pembacaan dan penghitungan variabel respons imun pada mukosa ileum mencit,
6. Dr. Sarmanu, drh, MS., selaku guru saya, penguji dan konsultan dalam analisis statistik dan penyusunan tesis ini,
7. Dr. I Ketut Suidiana, M.Kes.; selaku kolega dan penguji serta atas bantuan saran, kritik dan komentarnya dalam penyusunan tesis ini,
8. Dra. Sri Musta'ina , M.Kes.; Sdr. Lenny; dan Sdr. Bayu atas bantuannya dalam pewarnaan d PAS; Drs. Supeni, M.Kes dan Sdr. Lavatini, SKM., atas bantuannya dalam pemrosesan jaringan dan pewarnaan HE, serta semua staf Gramik dan staf Patologi Anatomi FK Universitas Airlangga,
9. Para Bapak dan Ibu guru saya di jurusan Biologi FMIPA Unair, di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unair dan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga,
10. Ayahanda dan ibunda tercinta, yang dengan penuh pengorbanan telah mendidik saya yang memungkinkan saya mengikuti pendidikan Program Pascasarjana, dengan rasa haru kehadiran beliau berdua saya mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi tingginya,

11. Istri saya tercinta, Dra. Sukiyati, S.Ag., dan kedua putri saya tercinta, Ayu Aisah Zuraidah dan Alfinda Rahma Zuraidah, yang dengan penuh pengertian dapat menciptakan suasana dan memberikan dorongan semangat hingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini,
12. Kepada semua fihak dan handai taulan serta kawan dan sejawat yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah ikut membantu dan memberikan dorongan dan do'a untuk segera menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata, tiada gading yang tak retak, saya persembahkan tesis ini kepada almamater tercinta Universitas Airlangga yang telah memberikan asuhan kepada saya selama ini, semoga dengan segala kekurangan yang ada, tulisan ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Surabaya, Januari 2000

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	i
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Karakteristik Benzopirin	7
2.2 Benzopirin Senyawa Karsinogenik	10
2.3 Benzopirin Dan Sistim Imun.....	13
2.4 Tinjauan Tentang Sistim Imun	16
2.5 Sistim Imun Pada Mukosa usus	22
2.6 Penghunian Mukosa (<i>mucosal Homing</i>)	30
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	32
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	32

3.2 Hipotesis Penelitian	36
BAB 4. METODE PENELITIAN	37
4.1 Rancangan Penelitian	37
4.2 Sampel dan Besar Sampel Penelitian	38
4.3 Variabel Penelitian	40
4.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian	40
4.5 Bahan dan Alat Penelitian	42
4.6 Prosedur Pelaksanaan Penelitian	43
4.7 Prosedur Pembuatan Sediaan Histopatologi Mukosa Ileum	46
4.8 Analisis Data	47
BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	48
5.1 Hasil Penelitian	48
5.2 Analisis Data Hasil Penelitian	68
BAB 6. PEMBAHASAN	77
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	85
7.1 Kesimpulan	85
7.2 Saran	86
DAFTAR PUSTAKA	87
LAMPIRAN	91

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbedaan sifat sistim imun non spesifik dan spesifik	17
Tabel 5.1 Rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin dosis 0,10 dan 20 mg/kg BB	49
Tabel 5.2 Rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin selama 1, 2, 4 dan 8 minggu	49
Tabel 5.3 Rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit dengan kombinasi dosis dan waktu paparan benzopirin	50
Tabel 5.4 Rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin dosis 0,10 dan 20 mg/kg BB	55
Tabel 5.5 Rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin selama 1, 2, 4 dan 8 minggu	56
Tabel 5.6 Rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit dengan kombinasi dosis dan waktu paparan benzopirin	56
Tabel 5.7 Rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin dosis 0,10 dan 20 mg/kg BB	61
Tabel 5.8 Rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin selama 1, 2, 4 dan 8 minggu	61
Tabel 5.9 Rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit dengan kombinasi dosis dan waktu paparan benzopirin	62
Tabel 5.10 Rangkuman analisis varians dua arah terhadap rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin	70
Tabel 5.11 Rangkuman analisis varians dua arah terhadap rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin ..	72
Tabel 5.12 Rangkuman analisis varians dua arah terhadap rerata jumlah Sel plasma aktif mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin	75

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur senyawa benzopirin	7
Gambar 2.2 Terjadinya benzopirin pada reaksi pirolisis	8
Gambar 2.3 Biotransformasi dan aktivasi metabolisme senyawa Karsinogenik benzopirin	12
Gambar 2.4 Difrensiasi sel leluhur menjadi berbagai sel yang Mempunyai kemampuan dalam sistim imunitas	18
Gambar 2.5 Irisan pada Peyer's patch dari ileum mencit	27
Gambar 2.6. Diagram limfosit normal	28
Gambar 2.7. Diagram makrofag	29
Gambar 2.8. Diagram sel plasma aktif	29
Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual penelitian	35
Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian	37
Gambar 5.1 Histogram rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit Setelah pemaparan benzopirin	57
Gambar 5.2 Grafik rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit Setelah pemaparan benzopirin	52
Gambar 5.3 Limfosit pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit	54
Gambar 5.4 Histogram rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin	57
Gambar 5.5 Grafik rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin	58
Gambar 5.6 Makrofag pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit	60

Gambar 5.7	Histogram rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin.....	63
Gambar 5.8	Grafik rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin	64
Gambar 5.9	Sel plasma aktif pada struktur histpatologik mukosa ileum mencit	66
Gambar 5.10.	Sel plasma aktif pada struktur histopatologis mukosa ileum mencit	

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Benzopirin merupakan senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon (PAH), yang banyak terdapat dalam asap rokok, gas buangan kendaraan bermotor, asap dari proses pembakaran bahan bakar organik, serta makanan yang diasap atau dipanggang. Senyawa benzopirin yang masuk ke dalam tubuh bersifat imunotoksik dan immunosupresif yang berkemampuan menekan sistem imunitas tubuh (Hardin, 1992; Hengartner, 1996). Sifat immunosupresif benzopirin dilakukan melalui hambatan pada perkembangan berbagai sel imunokompeten, terutama respons imun yang diperankan oleh sel T (Davila, 1996) dan sel penghasil antibodi (Goodman, 1994). Di samping bersifat imunotoksik dan immunosupresif, benzopirin juga bersifat prekarsinogenik. Dengan adanya aktivitas ezim di dalam sel, maka senyawa ini akan berubah menjadi senyawa karsinogenik yang dapat menyebabkan terbentuknya kanker, pada berbagai organ tubuh terutama organ tubuh yang ada di permukaan, seperti saluran pencernaan makanan, saluran pernafasan, kulit , payudara dan serviks (Casarette, 1986; Husen, 1998; Wasito, 1992). Sampai saat ini belum diketahui perubahan komponen sel imunokompeten yang menyebabkan terjadinya penurunan respons imun pada mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin.

Dalam kehidupan sehari-hari manusia tidak dapat menghindarkan diri dari paparan benzopirin, baik secara langsung maupun tidak langsung. Senyawa benzopirin yang ada di lingkungan dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui berbagai cara, antara lain melalui saluran pencernaan makanan, saluran pernafasan, dan kulit (Martoprawiro, 1992). Untuk mengatasi pengaruh paparan benzopirin yang merugikan yang masuk bersama makanan, mukosa usus telah dilengkapi dengan kemampuan berupa sistem imun mukosal, yang berperan memberikan pertahanan lokal pada mukosa usus. Sistem imun khusus ini terdiri dari lapisan mukous yang terdiri atas sistem imun spesifik dan sistem imun nonspesifik, serta *mucosal immune surveillance* (Putra, 1997). Paparan senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon, dilaporkan dapat menurunkan respons imun, terutama yang diperankan oleh limfosit T (Davila, 1996), dan meningkatkan kasus terjadinya sel kanker (Weiss, 1993).

Sebagaimana telah diketahui, bahwa makanan dan minuman yang masuk ke dalam tubuh, akan diserap oleh tubuh melalui mukosa saluran pencernaan. Untuk fungsi tersebut mukosa saluran pencernaan, telah dilengkapi dengan sistem ketahanan khusus, yaitu sistem imun mukosal yang merupakan bagian dari sistem imun spesifik (Soeparto, 1997). Jika respons imun mukosal mengalami penurunan jumlah maupun fungsi, karena induksi senyawa kimia yang bersifat imunotoksik dan immunosupresif yang masuk bersama makanan, maka diasumsikan dapat menyebabkan terjadinya peningkatan progresivitas sel kanker pada mukosa usus, yang selanjutnya dapat menyebabkan terjadi kanker usus. Sejauh ini penelitian tentang pengaruh

paparan benzopirin terhadap penurunan jumlah maupun fungsi dari respon imun, pada mukosa ileum mencit belum banyak diungkap. Hal ini disebabkan karena respons imun mukosal, merupakan bidang ilmu yang relatif masih baru berkembang, dan memerlukan kajian penelitian lebih lanjut.

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Dean (1989, dalam Marhendra, 1995), pemaparan beberapa jenis senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon, termasuk benzopirin dapat menekan pembentukan antibodi. Benzopirin bereaksi dengan cara menghalangi produk interleukin-1 (IL-1) yang menyebabkan terjadinya kelainan induksi kimia pada fungsi sel. Menurut Stutman (1979, dalam Putra, 1997a), pemberian senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon, seperti 3- *methylcholantrene* atau 7,12 *dimethylbenzanthracene* (DMBA), pada tikus akan dapat mengganggu *immune surveillance*, karena bahan tersebut dapat menekan respons imun seluler. Bahan DMBA dapat menghambat aktifitas limfosit *T helper* dan pertumbuhan limfosit B. Di samping itu menurut Davila (1996), pemaparan beberapa senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon yang bersifat sangat imunotoksik, seperti benzopirin, berpotensi menurunkan respons sel T pada tikus.

Secara morfologi jaringan mukosa usus terdiri atas jaringan limfoid terorganisasi (*mucosal lymphoid aggregates*) dan jaringan limfoid tersebar (*diffuse mucosal lymphoid tissue*). Jaringan limfoid terorganisasi terdiri atas sel M, *dome area*, dan folikel. Sedangkan jaringan limfoid tersebar terdiri atas IEL (*Intra Epithelial Lymphocyte*) dan LPL (*Lamina Propria Lymphocyte*)

(Strober, 1994). Penggunaan gambaran morfologik jaringan atau sel yang sedang berfungsi, dalam suatu penelitian sangat penting digunakan untuk menegakkan diagnosis suatu penyakit, bahkan ikut menentukan tindakan pengobatan. Mengingat timbulnya suatu penyakit disebabkan oleh adanya kemunduran absolut atau relatif dari sistim pertahanan tubuh, baik secara humoral maupun secara seluler. Untuk mengetahui patogenesis maupun tindakan pengobatan suatu penyakit, pengetahuan fungsional ini dapat ikut menyertai pengetahuan morfologik yang telah ada . Dengan demikian maka dapat difahami bahwa suatu gambaran yang tampak merupakan akibat dari suatu proses (Putra, 1984).

Berkaitan dengan berbagai fakta pada latar belakang tersebut di atas, sampai saat ini belum ada penjelasan maupun pembuktian tentang pengaruh paparan benzopirin terhadap penurunan respons imun pada mukosa ileum mencit, terutama yang dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kanker usus. Untuk itu dipandang perlu untuk dilakukan penelitian tentang **“Pengaruh Paparan Benzopirin Terhadap Penurunan Respons Imun Mukosa Ileum Mencit (*Mus musculus*, L)”**, dengan menggunakan hewan coba sebagai model gangguan respons imun mukosa ileum dalam keadaan terpapar benzopirin, dengan dosis, waktu paparan serta dosis dan waktu paparan yang berbeda. Paradigma yang digunakan dalam penelitian ini adalah paradigma patobiologik yang berkonsep imunopatobiologik. Untuk mengempirikkan berbagai variabel komponen respons imun digunakan pemeriksaan variabel berdasarkan konsep morfofungsi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda menurunkan jumlah limfosit pada mukosa ileum mencit ?
2. Apakah paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda menurunkan jumlah makrofag pada mukosa ileum mencit ?
3. Apakah paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda menurunkan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum mencit ?.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan penurunan komponen sel imunokompeten yang menyebabkan penurunan respons imun pada mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan terjadinya penurunan jumlah limfosit pada mukosa ileum menci yang terpapar benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda.
2. Membuktikan terjadinya penurunan jumlah makrofag pada mukosa ileum menci yang terpapar benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda.
3. Membuktikan terjadinya penurunan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum menci yang terpapar benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda.

1.4 Manfaat Penelitian

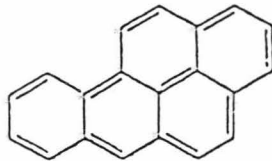
Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi ilmiah, dalam mengungkap penurunan respons imun pada mukosa ileum menci yang terpapar benzopirin. Informasi ini dapat digunakan sebagai upaya pencegahan paparan benzopirin lebih lanjut, untuk menghindari terjadinya peningkatan karsinogenesis dan terjadinya kanker usus, berdasarkan paradigma patobiologik yang berkonsep imunopatobiologik, dan pemeriksaan variabel secara morfofungsi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

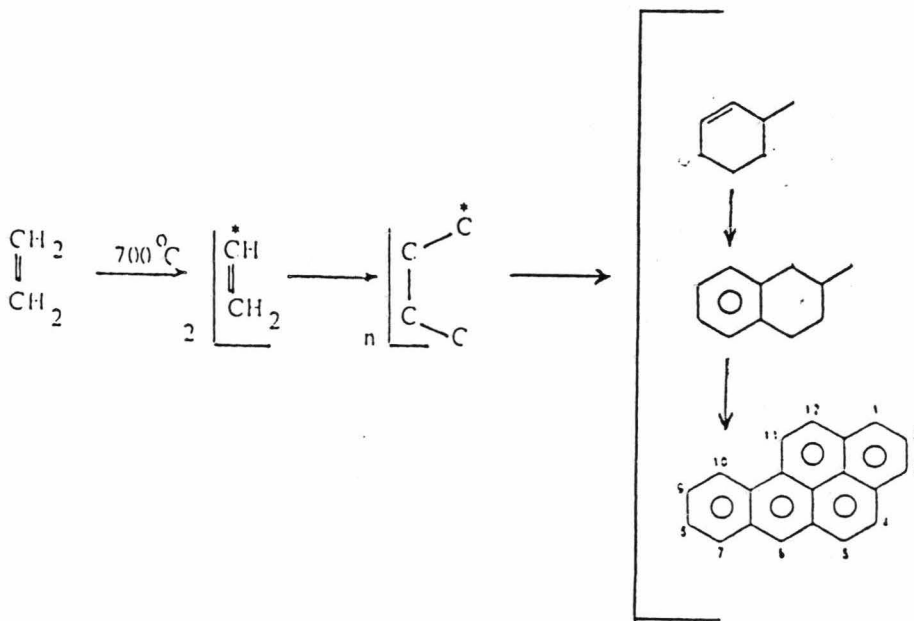
2.1 Karakteristik Benzopirin

Benzopirin atau 1,2 benzapirena disingkat B[a]P, adalah senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon (PAH) yang banyak terdapat dalam asap rokok, gas buangan kendaraan bermotor, asap dari proses pembakaran bahan bakar organik dan makanan yang diasap atau dipanggang. Pada mulanya senyawa benzopirin ini dijumpai pada tar dari arang, yang diduga terjadi karena pembakaran yang tidak sempurna dari bahan bakar fosil, seperti minyak bumi, batubara dan sebagainya (Sugianto, 1992). Senyawa benzopirin berupa kristal monoklin atau ortorombik (gambar 1), berwarna kekuningan, berbentuk jarum, mempunyai massa molekul (M_r) = 252,3 dengan titik lebur $179 - 179,3^\circ \text{C}$, larut dalam benzena, toluena, xylene, alkohol, dan metanol. Praktis tidak larut dalam air (Pudjiastuti, 1998).



Gambar 2.1. Benzo(a)pyrena (Casarett, 1986)

Senyawa benzopirin merupakan salah satu senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon, yang saat ini paling banyak diteliti karena bersifat imunotoksik, immunosupresif, dan karsinogenik. Terjadinya senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon ini diduga karena terjadinya pembakaran yang tidak sempurna dari bahan bakar fosil atau bahan organik, melalui proses polimerisasi radikal bebas karena reaksi pirolisis (Sugiarto, 1992).



Gambar 2.2. Terjadinya benzopirin pada reaksi pirolisis (Sugiarto,1992)

Senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon merupakan turunan benzena, dengan atom karbon yang digunakan bersama di antara cincin benzena. Sifat karsinogenik senyawa ini tergantung pada jumlah cincin benzena yang terdapat pada molekul tersebut. Substansi yang mempunyai kurang dari 4 cincin benzena tidak bersifat karsinogenik, substansi dengan 4 cincin benzena bersifat karsinogenik, sedangkan substansi yang mempunyai 5 atau lebih cincin

benzena, umumnya sangat karsinogenik dan potensial sebagai penyebab kanker (Klein, 1982; Casarett, 1986).

Pada tahap awal, senyawa B[a]P yang masuk ke dalam sel tubuh akan mengalami reaksi epoksidasi atau metil hidroksilasi pada posisi 7,8, sehingga dihasilkan senyawa 4,5 dihidro 4,5 dihidrobenzo(a)pirena, 7,8 dihidro 7,8-dihidroksibenzo(a)pirena, 9,10 dihidro 9,10 dihidrobenzo(a)pirena dan lain sebagainya. Proses epoksidasi pada posisi 7,8 ini membutuhkan kompleks enzim *mixed function oxidase* (MFO) yang mengandung berbagai bentuk sitokrom P450 monooksigenase, yang terdapat dalam retikulum endoplasmik atau mikrosom. Kompleks enzim tersebut terdiri dari monooksigenase sitokrom reduktase dan komponen lipid (Sugianto, 1992). Sitokrom P 450 dan P 448 diketahui sebagai pembentuk oksigenase. Bentuk aktif yang paling potensial dalam menimbulkan malignansi adalah 4,5 epoksi benzo(a)pirena, yang mempunyai gugus epoksida di daerah K. Pada proses metabolisme B(a)P, terjadi pemasukan atom C no 4 dan 5 dalam cincin ke 2 yang menghasilkan senyawa epoksida. Dengan terbentuknya epoksida tersebut, menyebabkan ketidakstabilan pada cincin ke 2. (Murray, 1994 dalam Khotib,1998). Akibatnya bentuk aktif ini akan berubah menjadi ion karbonium yang dapat bergabung dengan makromolekul, termasuk DNA dan RNA yang menyebabkan terjadinya mutasi sel, sehingga dapat menyebabkan terjadinya gangguan fungsi sel, serta memulai terjadinya proses karsinogenesis (Kumar, 1997).

Pada proses metabolisme benzopirin banyak senyawa yang terbentuk, sebagian membutuhkan glutathion untuk reaksi konjugasi, sebagian yang lain membentuk ikatan dengan makromolekul, termasuk protein sel dan DNA. Senyawa yang berikatan dengan makromolekul merupakan senyawa epoksida atau arenoksida yang sangat reaktif, di mana cincin epoksida mudah sekali dipecah oleh oksigen sebagai inisator (Kumar, 1997). Setelah terbentuk ikatan antara 4,5 epoksida benzo(a)pirena pada basa purin dari DNA, akan mengakibatkan terjadinya *epurinic site* sehingga tidak ada pasangan basa tertentu yang mengarah DNA, akibatnya terjadi pengikatan basa secara acak atau bahkan mungkin akan terjadi pelipatan keluar dari rantai DNA, kemudian akan mengalami pemusatan. Hal ini akan menyebabkan terjadinya delesi yang menyebabkan terjadinya gangguan fungsi sel dan merupakan proses awal karsinogenesis.

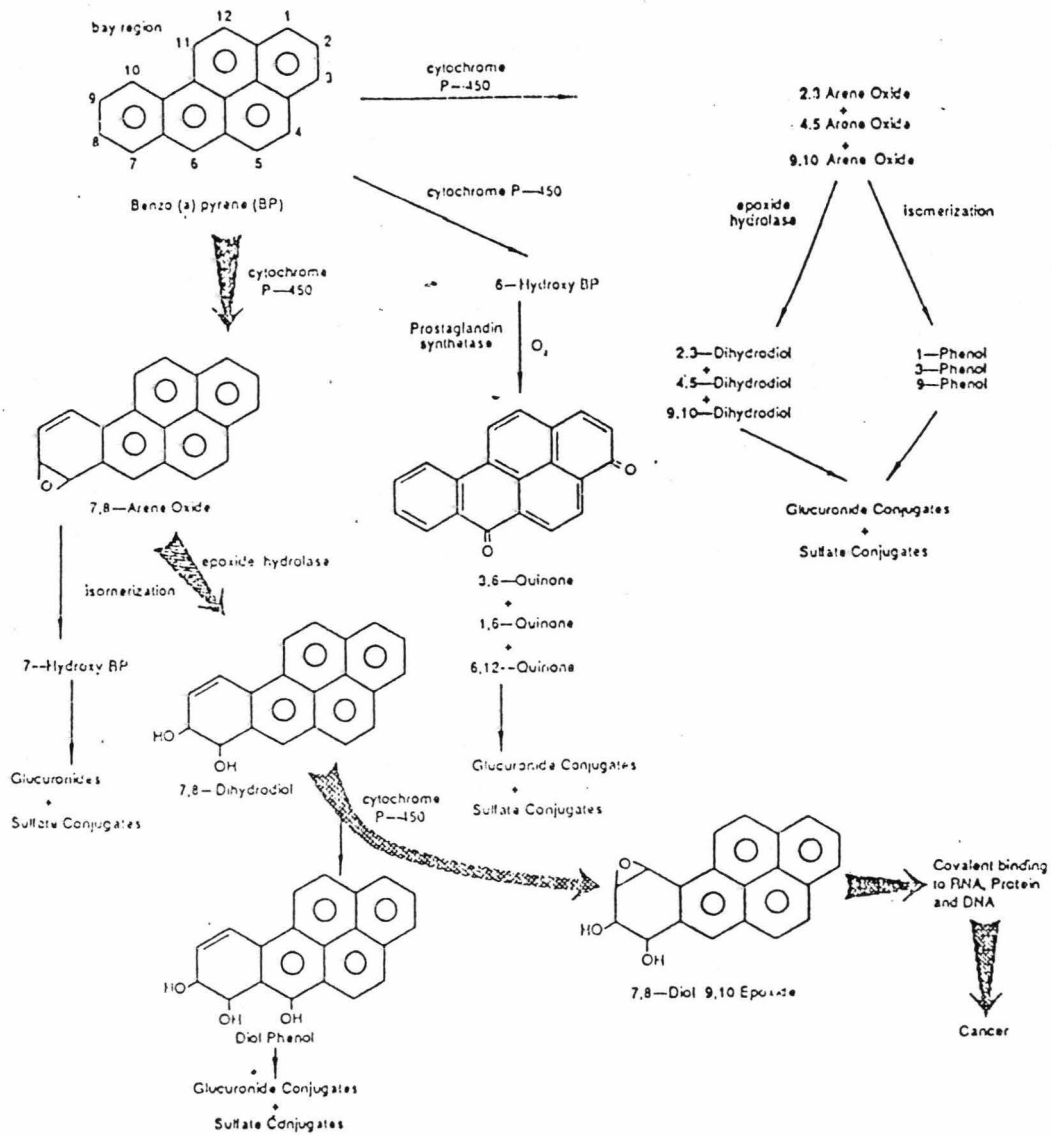
2.2 Benzopirin Senyawa Karsinogenik

Bahan kimia yang dapat menyebabkan abnormalitas sel dan dapat menginduksi karsinogenesis, disebut sebagai bahan karsinogenik. Beberapa substansi kimia pada tar dari arang yang dapat menginduksi terbentuknya kanker, diketahui sebagai senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon (Hardin, 1992).

Salah satu senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon yang bersifat karsinogenik adalah benzopirin (Gambar 1). Benzopirin sebenarnya merupakan suatu senyawa prekarsinogenik, yaitu suatu bahan yang akan menjadi

karsinogenik apabila membentuk senyawa *proximate carcinogen* dan *ultimate carcinogen* melalui aktivitas enzimatik (Hardin, 1992; Casarett, 1986). *Proximate carcinogen* adalah metabolit intermediet, sedangkan *ultimate carcinogen* merupakan metabolit akhir yang bersifat karsinogenik. Senyawa benzopirin setelah berada di dalam sel, pertama kali dimetabolisasi oleh *mixed function oxidase* (MFO) yang mengandung berbagai bentuk sitokrom P 450 yang berlokasi pada membran retikulum endoplasmik, dengan hasil akhir berupa senyawa nontoksik dan senyawa karsinogenik (Gambar 2.4). Reaksi detoksifikasi yang menghasilkan senyawa nontoksik berasal dari perubahan senyawa epoksi menjadi senyawa fenol melalui reaksi enzimatik, berkonjugasi dengan glutation. Selanjutnya senyawa fenol bereaksi dengan asam difosfoglukuronat atau sulfat. Reaksi lain yang menghasilkan senyawa karsinogenik adalah reaksi yang mengubah senyawa epoksi menjadi dihidroksil atas peran enzim epoksi hidrolase menjadi benzopirena 7,8 diol. Selanjutnya senyawa tersebut dimetabolisasi menjadi *ultimate carcinogen*, yaitu benzopirena 7-8 dihidrodiol 9,10 epoksi, yang merupakan suatu senyawa yang sangat reaktif (Weiss, 1993).

Menurut Kumar (1997), senyawa *ultimate carcinogen* dapat membentuk ikatan dengan DNA, RNA dan protein dari sel sasaran. Aktivitas ini dilakukan dengan cara mengikat guanin yang merupakan basa DNA, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kesalahan dalam memilih pasangan basa pada waktu replikasi, Ikatan kovalen pereaksi elektrofilik pada DNA dapat menimbulkan terjadinya gangguan fungsi sel, karena terjadi kesalahan replikasi DNA, hibridisasi sel dan perubahan dalam kromosom.



Gambar 2.3. Biotransformasi dan aktivasi metabolisme senyawa karsinogenik benzopirin (de Bethizy et al., 1989).

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2.3 Benzopirin dan Sistem Imun

Sistem imun merupakan sistem ketahanan yang berfungsi menjaga keseimbangan dalam tubuh, dengan menggunakan berbagai komponen yang beredar di seluruh tubuh. Sistem imun ini terdiri atas suatu jaringan organ yang meliputi sumsum tulang, timus dan kelenjar getah bening. Organ ini membentuk berbagai komponen sel limfoid yang nantinya terlibat dalam respons imun. Sel limfoid dihasilkan dari sel pluripotent dalam sumsum tulang. Beberapa sel di proses lagi melalui timus menjadi limfosit T, sedangkan sel yang lain dikirim ke jaringan ekuivalen bursa menjadi limfosit B (Bellanti, 1993). Komponen sistem imun dapat dijumpai pada darah perifer, cairan limfatik dan jaringan limfoid yang meliputi sumsum, tulang, lien, timus, nodus limfatikus dan jaringan limfatik yang berhubungan dengan usus. Pembaharuan dan pemasakan sel-sel tersebut terjadi secara terus menerus, dan aktivitasnya akan tampak apabila terdapat agen yang menginfeksi atau adanya pembentukan tumor. Pengaturan aktivitas ini didasarkan pada pengenalan atas *self* dan *non self*. Menurut Dean (1989), reaksi terhadap sesuatu yang *non self* merupakan suatu respons pertahanan (Marhendra, 1995).

Fungsi sistem imun dapat dibedakan atas dua mekanisme yaitu : mekanisme spesifik dan non spesifik. Mekanisme spesifik akan menghilangkan materi asing secara spesifik dan diperlukan sensitisasi. Mekanisme ini melibatkan produksi antibodi dan induksi efektor limfosit, yang menghasilkan respons imun yang dikenal sebagai respons imun humoral dan respons imun seluler. Karakteristik dari respons ini adalah adanya spesifitas, heterogenitas

dan memori. Respons ini mempunyai dua komponen, yaitu komponen primer yang terjadi pada paparan pertama antara sel imunokompeten dengan antigen yang diikuti dengan fase induksi, yaitu selama proliferasi limfosit belum selesai dan belum ada antibodi atau mediator yang dihasilkan untuk berikatan dengan agen tersebut. Komponen respons imun sekunder muncul apabila ada kontak selanjutnya antara agen yang sama. Kontak ini memicu pengamanan ketahanan imunologik dengan produksi antibodi yang spesifik. Mekanisme respons imun yang terjadi adalah mekanisme respons imun humoral, dan respons imun seluler. Sebaliknya pada mekanisme respons imun non spesifik, terjadi tanggapan terhadap materi asing secara tidak spesifik dan tidak diperlukan sensitisasi, mekanisme ini melibatkan sel fagositik, yaitu granulosit dan makrofag (Bellanti, 1993).

Materi yang dapat menimbulkan reaksi imunitas antara lain adalah protein asing (bakteri, virus), sel sendiri yang telah mengalami perubahan sifat biokimia karena tua dan mati, neoplasma atau bahan kimia yang bersifat imunotoksik dan immunosupresif (Khatib, 1998). Hubungan antara penekanan imunitas dengan pembentukan berbagai jenis kanker telah dibuktikan pada hewan coba yang diperlakukan dengan bahan kimia yang dapat menekan imunitas (Marhendra, 1995). Perlakuan yang menyebabkan penekanan imunitas akan menyebabkan peningkatan terbentuknya kanker dan terjadinya penyakit infeksi (Khatib, 1998). Respons imunologik terhadap bahan kimia kelompok xenobiotik telah banyak dilakukan penelitian. Salah satu kelompok

xenobiotik yang dapat mengubah fungsi imunitas adalah senyawa hidrokarbon aromatis polisiklik, salah satu diantaranya adalah benzopirin (Hardin, 1992).

Berdasarkan adanya indikasi sifat imunotoksik oleh senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon, yang bersifat karsinogenik seperti benzopirin, menunjukkan bahwa senyawa kimia yang berpotensi karsinogenik bersifat immunosupresif yang dapat menekan sistim imunitas. Pendapat ini mempertegas bahwa semua bahan kimia yang berpotensi menekan imunitas, diduga dapat merupakan faktor penyebab terbentuknya sel kanker, melalui perubahan kemampuan imunitas (Marhendra, 1995).

Menurut Stutman (1979, pada Putra, 1997b), pemberian *3-methylcholantrene* atau *7,12 dimethylantracene* (DMBA), pada tikus dapat mengganggu *immune surveillance*, karena bahan tersebut dapat menekan respons imun seluler. Bahan DMBA dapat menghambat aktifitas limfosit *T helper cell* dan pertumbuhan limfosit B. Di samping itu menurut Davila (1996), pemaparan beberapa senyawa hidrokarbon aromatis polisiklik yang bersifat immunosupresif, dilaporkan bahwa benzopirin bersifat sangat imunotoksik, dan berpotensi menurunkan respons sel T pada tikus. Benzopirin mampu menekan imunitas humoral, melalui penghambatan pembentukan antibodi, juga terjadi penekanan limfopoesis dan juga mampu menekan imunitas yang diperantarai oleh sel (Davila, 1996).

2.4 Tinjauan Tentang Sistem Imun

Sistem imun merupakan sistem yang berperan ganda dalam usaha menjaga keseimbangan dalam tubuh. Bertugas mengatur keadaan keseimbangan dengan menggunakan komponennya yang beredar pada seluruh tubuh, agar supaya dapat mencapai sasaran yang jauh dari pusat (Subowo, 1993). Menurut Bellanti (1993), konsep tentang imunitas adalah suatu mekanisme yang bersifat fisiologik, melengkapi binatang atau manusia, dengan suatu kemampuan untuk mengenal suatu zat sebagai asing terhadap dirinya, yang selanjutnya tubuh akan mengadakan tindakan dalam bentuk netralisasi, melengkapkan, atau memasukkan dalam proses metabolisme untuk memusnahkannya tanpa menimbulkan pengaruh, baik berupa reaksi fisiologik maupun patologik (Abbas, 1994). Ada atau tidak adanya tindakan oleh tubuh, terhadap suatu bahan yang masuk disebut respons imun, yaitu kemampuan pengenalan terhadap bahan asing atau tidak. Walaupun bahan itu berasal dari tubuh sendiri, namun apabila dikenal asing, tubuh akan mengambil tindakan, tetapi sebaliknya walaupun bahan tersebut berasal dari luar, dapat dikenal sebagai bahan yang tidak asing. (Subowo, 1993; Barata Widjaya, 1996).

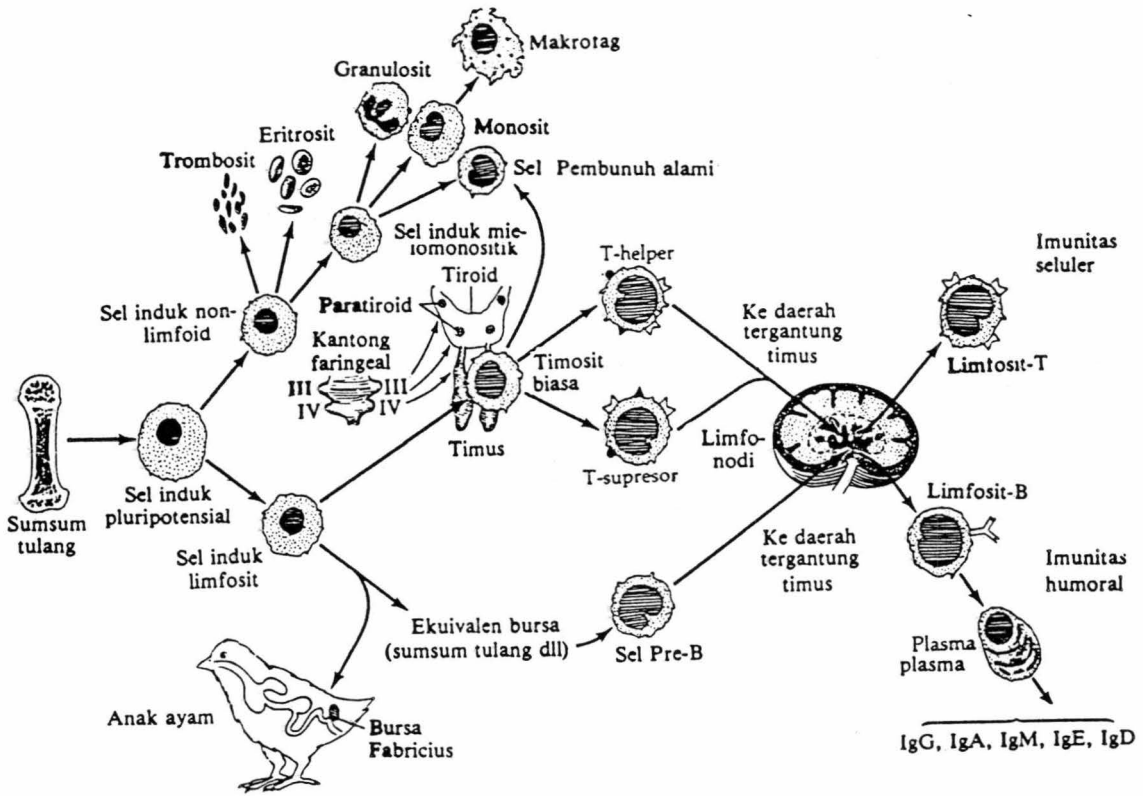
Sel yang terlibat dalam sistem imun, berasal dari sel induk hemopoetik (*hemopoetic stem cell*) yang berasal dari *yolk sac* embrio dan mengalami migrasi pada sumsum tulang. Selanjutnya berdiferensiasi pada sumsum tulang, limfa, dan kelenjar getah bening, menjadi berbagai komponen sel limfoid (Soeparto, 1997).

Beberapa sel diproses lagi melalui timus menjadi sel T, sedang yang lain memasuki peredaran darah, berdiferensiasi menjadi sel B dan sel mieloid, kemudian membentuk monosit, mastosit dan sel polimorfonuklear. Berbagai sel tersebut masuk ke berbagai jaringan, yang berperan dalam sistem imunitas tubuh (Barata Widjaya, 1996 ; Soeparto,1997).

Sistem imun dapat dibedakan menjadi dua, yaitu sistem imun alamiah atau non spesifik (*natural / innate*) dan sistem imun didapat atau spesifik (*adaptive / acquired*). Sistem imun non spesifik bersifat alami, merupakan ketahanan imunologik yang pertama muncul, pada infeksi mikroba ataupun makromolekul yang tidak membedakan jenis penyebab infeksi. Sedangkan sistem imun spesifik, merupakan mekanisme pertahanan tubuh, yang dipacu oleh paparan suatu zat asing tertentu. Sistem imun spesifik lebih efektif dan lebih terfokus pada suatu paparan antigen tertentu (Abbas, 1994).

Tabel 2.1. Perbedaan Sifat Sistem Imun Non Spesifik dan Spesifik
(Barata Widjaya, 1996)

	Non Spesifik	Spesifik
Resistensi	Tidak berubah oleh infeksi	Membaik oleh infeksi berulang
Spesifikasi	Umumnya efektif terhadap semua mikro organisme	Spesifikasi untuk mikro organisme yang merangsang
Sel yang penting	Fagosit Sel NK Sel K	Limfosit
Molekul yang penting	Lisazim Komplemen Protein fase akut Interferon (Sitokin)	Antibodi Sitokin
Media pelarut aktif pada sel lain	Sitokin produk makrofag	Sitokin produk limfosit



Gambar 2.5. Diferensiasi sel leluhur menjadi berbagai sel yang mempunyai kemampuan dalam sistim imunitas (Bellanti,1993)

Sistim imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena itu dapat memberikan respons langsung terhadap antigen. Sedangkan sistim imun spesifik, membutuhkan waktu tertentu untuk mengenal antigen terlebih dahulu, sebelum dapat memberikan responsnya (Barata Widjaya,1996; Bellanti, 1993).

Berbagai komponen sistim imun non spesifik terdiri atas :

1. Pertahanan fisik dan mekanik terhadap infeksi, yaitu dengan menghambat pengikatan atau penetrasi oleh agen infeksi. Pertahanan tersebut terdapat pada kulit yang utuh, selaput lendir, silia saluran nafas, lapisan pembungkus sel yang membawa mikroba dan agen infeksi pada ludah, keringat, urin, dan berbagai cairan tubuh lainnya.
2. Pertahanan biokimia (bahan larut), diwujudkan dalam bentuk pengaturan pH dari keringat dan sekresi kelenjar sebaceous. Berbagai asam lemak dan enzim yang mempunyai efek antimikrobia, akan mengurangi kemungkinan infeksi melalui kulit. Bahan yang disekresi mukosa saluran nafas dan telinga, berperan pula dalam pertahanan tubuh secara biokimiawi. Lisosim dalam keringat, ludah, air mata, dan air susu, melindungi tubuh terhadap berbagai kuman gram positif.
3. Pertahanan humoral, berupa komplemen, interferon dan C-reaktif protein (CRP). Komplemen berperan dalam meningkatkan fagositosis (opsonisasi) dan mempermudah destruksi bakteri dan parasit. Interferon

berperanan dalam mengaktifkan *natural killer cell* (sel NK), sedangkan CRP berupa opsonin yang mempermudah proses fagositosis.

4. Pertahanan seluler, berupa fagosit, makrofag, sel K dan berbagai sel limfositik yang bersifat sitotoksik, seperti sel NK, sel sitotoksik terkait antibodi, sel *lymphokin activating killer* (LAK) dan limfosit yang berinfiltrasi pada tumor. (Barata Widjaya, 1996; Sigal, 1994).

Berbeda dengan sistim imun nonspesifik, sistim imun spesifik mempunyai kemampuan dalam mengenal berbagai benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali muncul dalam tubuh, segera dikenal oleh sistim imun spesifik, sehingga terjadi sensitisasi sel imun. Bila sel sistim imun tersebut berpapasan kembali dengan benda asing yang sama maka benda asing yang terakhir ini akan dikenal lebih cepat, kemudian dihancurkannya. Karakteristik respons imun spesifik ini adalah adanya spesifitas, heterogenitas dan memori. Mekanisme sistim imun spesifik dibagi menjadi dua fase yaitu fase pengenalan antigen dan fase efektor (Sigal, 1994). Atas dasar komponen sistim imun yang menjadi media, sistim imun spesifik dapat dibedakan menjadi dua.

1. Sistim imun spesifik humoral, di mana yang berperanan dalam sistim imun spesifik humoral ini adalah limfosit B atau sel B. Bila sel B dirangsang oleh benda asing, maka sel B akan berproliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang dapat membentuk antibodi, yang mempunyai kemampuan mengenali dan mengeliminasi antigen.

2. Sistem imun spesifik seluler, dimana sel yang berperan adalah limfosit T atau sel T dan sel fagositik. Berbeda dengan sel B, sel T terdiri atas beberapa sel subset dengan fungsi yang berlainan. Fungsi utama sistem imun spesifik seluler adalah untuk pertahanan terhadap bakteri yang hidup intra seluler, virus, jamur, parasit dan sel yang mengalami keganasan (Barata Widjaya,1996; Sigal, 1994).

Dalam sistem imun spesifik, sel T berasal dari asal yang sama dengan sel B. pada orang dewasa sel T dibentuk di dalam sumsum tulang, tetapi proliferasi dan diferensiasinya terjadi di dalam kelenjar timus. Setelah memasuki timus, sel T akan memasuki darah dan merupakan 70% dari limfosit yang beredar. Bila terjadi kontak dengan imunogen yang diproses oleh makrofag, sel T akan mengalami proliferasi dan diferensiasi. Beberapa sel akan teraktivasi dan berperan dalam respons imun seluler, sebagian yang lain menjadi sel T memori, yang akan diaktifkan bila bergabung dengan antigen, sisanya menjadi sel T penolong (*T helper*) dan T supresor yang membantu mengatur produksi antibodi oleh sel B. Sel B akan memasuki darah dan merupakan 30% dari limfosit darah. Bila terjadi kontak dengan antigen, maka sel B akan berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi sel plasma dan sel B memori. Sel plasma selanjutnya akan mengalami aktivasi menjadi sel plasma aktif yang mampu memproduksi berbagai imunoglobulin atau antibodi (Stites, 1994).

2.5 Sistem Imun pada Mukosa Usus

Sistem imun pada jaringan mukosa usus merupakan sistem imun tersendiri yang melengkapi sistem imunitas tubuh. Sistem imun ini berperan memberikan pertahanan lokal pada mukosa usus. Untuk melaksanakan fungsi tersebut, mukosa usus telah dilengkapi dengan kemampuan berupa ketahanan mukosal yang terdiri atas:

1. lapisan mukous, yang terdiri atas ketahanan tubuh nonspesifik (asam lambung, berbagai enzim pencernaan, dan lain sebagainya) dan ketahanan tubuh spesifik (terutama sIgA dan dalam kontribusi kecil yang dilakukan oleh sIgM),
2. *Mucosal immune surveillance*.

Secara morfofungsi jaringan mukosa usus terdiri atas jaringan limfoid terorganisasi (*mucosal lymphoid aggregates*) dan jaringan limfoid tersebar (*diffuse mucosal lymphoid tissue*). Jaringan limfoid terorganisasi di mukosa usus merupakan daerah aferen, di mana antigen masuk melalui epitel khusus dan menimbulkan respons imun.

Menurut Stober (1994), Jaringan limfoid terorganisasi terdiri atas tiga komponen.

1. Sel M atau FAE (*Follicle Associated Epithelial*)

Sel M (*Microfold*) merupakan sel epitel pipih, yang sangat sedikit mempunyai bulu getar (*brush border*), dengan *glycocalyx* yang tipis , sitoplasma kaya dengan vesikel pinositosis, tidak mempunyai kemampuan proteolitik dan tidak dapat mengekspresikan MHC kelas II. berperan

menangkap antigen atau imunogen. Mula-mula sel M menangkap imunogen dengan cara mengikatnya di permukaan, kemudian dimasukkan dengan cara pinositosis atau endositosis, vesikel pinositosis yang berisi imunogen, melintas dari permukaan luar ke permukaan dalam sel M. selanjutnya imunogen dilepas ke area sub epitelial.

2. *Dome Area*

Dome area merupakan daerah epitel penutup mukosa, banyak mengandung berbagai sel yang dapat mengekspresikan MHC kelas II, seperti makrofag, sel dendritik, dan limfosit B. Dengan demikian dome area ini mempunyai kemampuan sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) yang mampu menampilkan epitop antigen untuk dikenali oleh limfosit. *Dome area* juga banyak mengandung sel T, terutama sel T *helper* (CD4). Berbagai sel pada *dome area* juga dimungkinkan sebagai *contra supressor cells*.

3. Folikel

Folikel terletak di bawah *dome area* berisi germinal center (GC), merupakan daerah yang didominasi oleh limfosit B yang sebagian besar menampilkan IgA permukaan. Di daerah sekitar folikel dan interfolikel, banyak dijumpai limfosit T, terutama limfosit T *supressor/sitotoksik* (CD8).

Jaringan limfoid tersebar di mukosa usus merupakan daerah eferen, yaitu daerah tempat imunogen berinteraksi dengan sel yang sudah berdiferensiasi untuk menimbulkan respons imun.



Populasi sel yang terdapat pada jaringan limfoid tersebar menurut Strober (1994), terdiri atas .

1. *Intra Epithelial Lymphocyte (IEL)*

IEL merupakan populasi limfosit yang berada di atas membrana basalis dari sel (*basement membrane*), di antara sel epitel. Dalam keadaan normal jumlah sel ini sangat sedikit, terdiri atas populasi sel T (CD2), (CD3) dan (CD8), namun dalam keadaan peradangan populasinya akan meningkat. Hunian LPL di sini sangat heterogen, kebanyakan terdiri dari sel T CD8. Separoh dari sel T CD8+ berasal dari timus, dan melakukan migrasi ke *Peyer's patch* untuk selanjutnya sesudah terpapar antigen menghuni lamina propria. Proliferasi IEL dipicu melalui reseptor CD2, dan tidak melalui reseptor limfosit T (*TCR = T cell receptor*). Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa IEL merupakan efektor yang mempunyai aktifitas khusus sebagai sel pembunuh alami atau sel NK (*Natural Killer*), dan limfosit sitotoksik, mensekresi interferon gama (*IFN*) dengan disertai peningkatan ekspresi antigen MHC kelas II dan ekspresi TCR (*T cell receptor*). IEL dapat pula menunjukkan integrin yang canggih, yang dinamakan HML-1 (*human mucosal lymphocyte antigen-1*) dan merupakan media perantara untuk mudiknya (*homing*) atau retensi sel T khusus di dalam epitel mukosa usus.

2. *Lamina Propria Lymphocyte (LPL)*

Populasi LPL terdiri atas limfosit B dan T. limfosit B banyak didominasi oleh sel plasma IgA dan sel plasma IgM, IgG, dan IgE. Dalam jumlah yang sedikit dapat dijumpai limfosit B dan sel plasma IgM, IgG dan IgE. Pada keadaan inflamasi, semua sel pembentuk imunoglobulin akan meningkat jumlahnya, tetapi peningkatan jumlah yang menyolok akan tampak pada sel IgG. Sedangkan sel T di lamina propria terdiri atas sel T (CD4+) dan (CD8+), kebanyakan sel T CD8+, limfosit ini diketahui dalam keadaan aktif, karena telah mengalami aktivasi sebelumnya. Aktifitas sebagai sel T *helper* pada limfosit T (CD4+) di lamina propria lebih menonjol dibanding dengan limfosit T (CD4+) dari jaringan lain, yang kebanyakan berlaku sebagai sel supresor. Di samping itu juga ditemukan bahwa limfokin *helper* lebih banyak disekresi dari pada limfokin untuk keperluan proliferasi. Hal ini yang menunjukkan bahwa limfosit di lamina propria merupakan *memory T cell*. Di mana rasio CD4+ : CD8+ sama dengan di sirkulasi , yaitu 2:1.

3. Makrofag di lamina propria

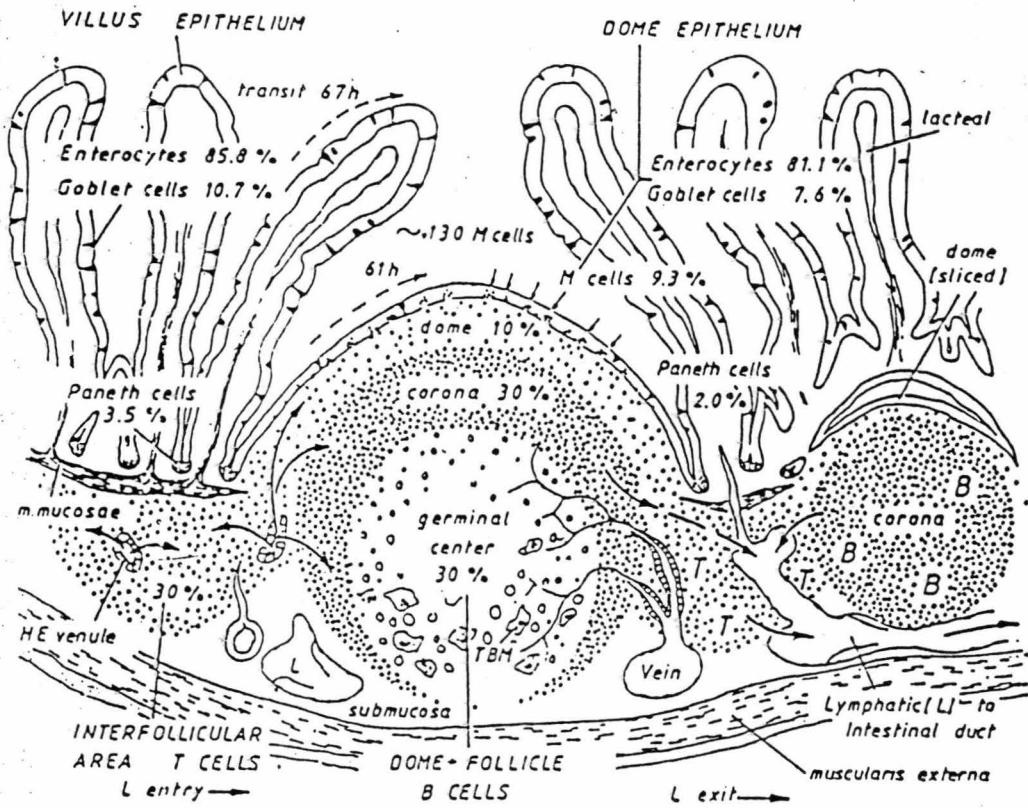
Makrofag ditemukan tersebar di mukosa, dan lebih banyak memusatkan diri di bagian superfisial lamina propria di bawah epitel. Seperti halnya limfosit mukosa, makrofag berasal dari jaringan GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissues*). Sebagian besar makrofag di

lamina propria menampilkan MHC kelas II dan marker permukaan lain, yang berkaitan dengan aktifitas fagositosis. Fenomena tersebut menunjukkan bahwa makrofag di lamina propria dalam keadaan aktif. Makrofag akan menghasilkan sitokin (IL-1 dan IL-6) yang diperlukan untuk diferensiasi limfosit B dan proses imun yang lain.

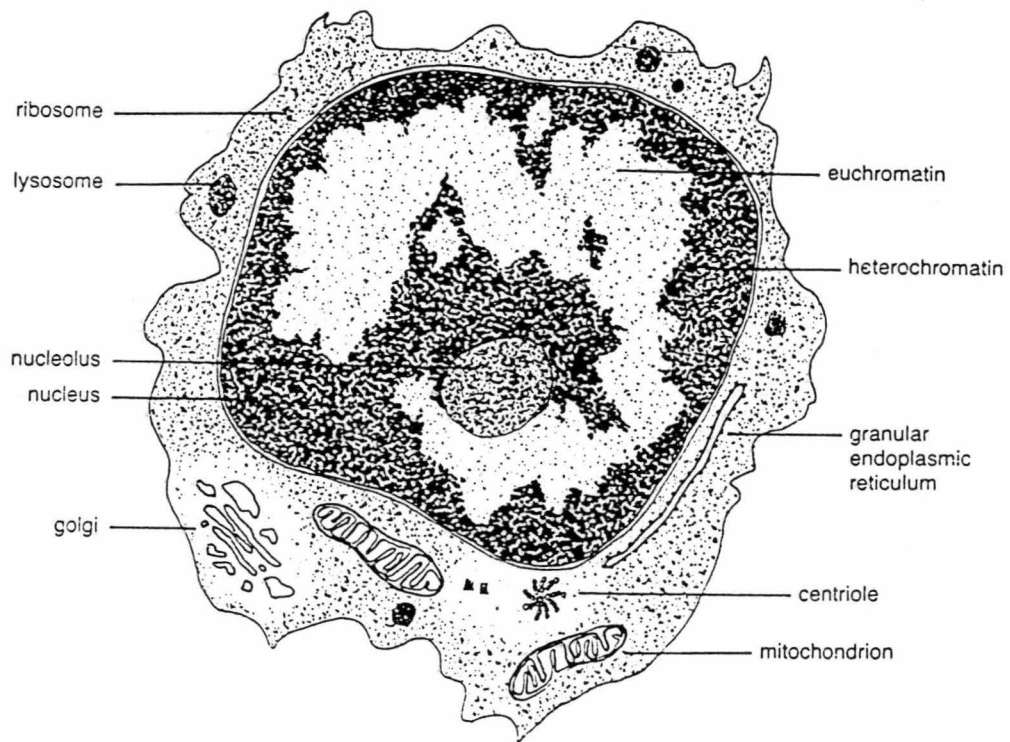
4. Sel NK, LAK, dan Mast Cell di lamina Propria

Di lamina propria terdapat juga sel yang mempunyai marka NK (CD16, CD 56), walaupun dalam jumlah dan aktifitas yang kurang. Sedangkan sel yang mempunyai fungsi sebagai LAK (*lymphokin activating killer*), lebih mudah dijumpai di antara LPL. Keadaan ini berbeda dengan sel NK yang banyak dijumpai pada IEL. Di mukosa banyak dijumpai *mast cell* yang belum dewasa (*mast cell precursors*), dan cepat mengalami pendewasaan bila ada rangsang yang cukup. Pendewasaan *mast cell* ini dipicu oleh IL-3 yang dihasilkan oleh limfosit T. Mediator yang dikeluarkan oleh sel mast ini, merupakan mekanisme yang penting untuk menarik berbagai sel radang masuk ke dalam jaringan mukosa, dan berpartisipasi dalam pertahanan tubuh lokal (Kato,1994; Strober,1994; Putra,1997; Soeparto,1997).

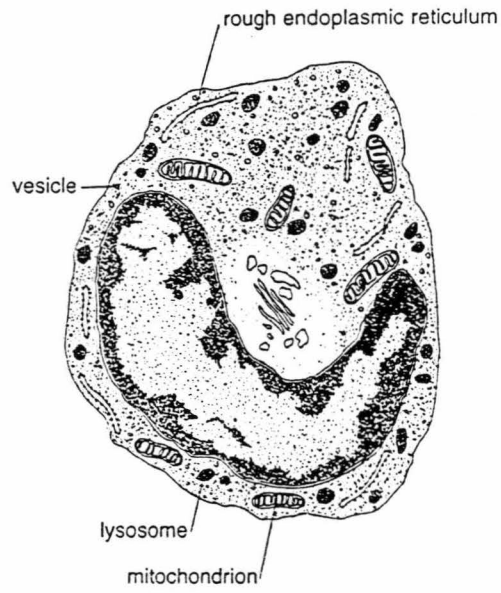
Gambaran irisan struktur mukosa ileum mencit yang mengandung *Peyers patches* ditunjukkan pada gambar 2.5.



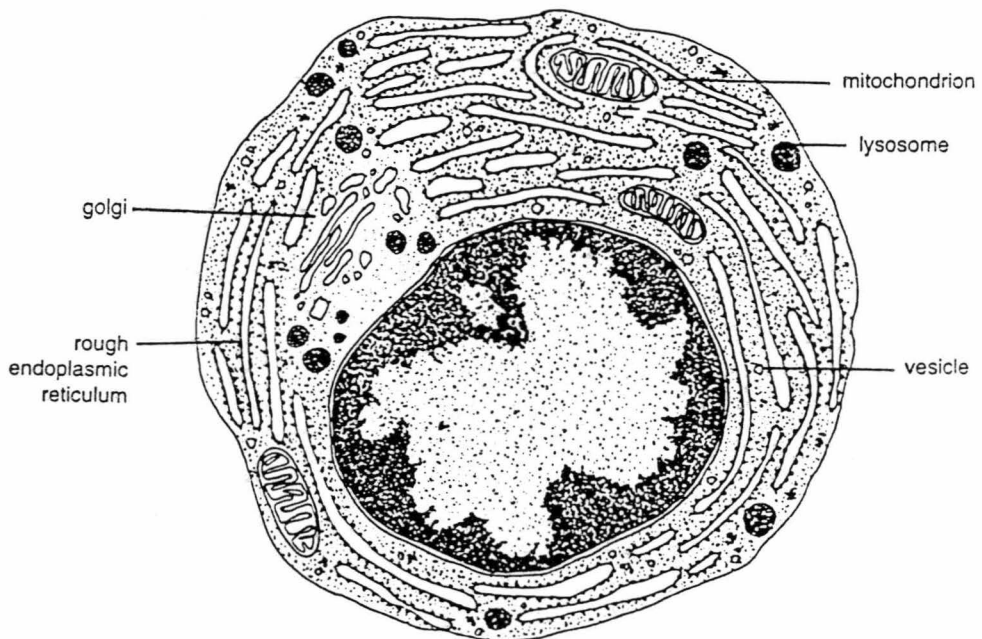
Gambar 2.5 Irisan pada Peyer's patch dari ileum menciit (Kato,1994).



Gambar 2.6. Diagram limfosit normal (Goodman, 1994)



Gambar 2.7. Diagram makrofag (Goodman,1994)



Gambar 2.8. Diagram sel plasma (Goodman,1994)

2.6 Penghunian Mukosa (*Mucosal Homing*)

Penghunian mukosa merupakan suatu penampilan yang karakteristik dari sistim imun mukosa, dengan kemampuan menghuni dari berbagai sel yang dibentuk di dalam folikel mukosa. Kemampuan *homing* dari berbagai sel tersebut di atas merupakan fenomena khas sistim imun mukosal. Mekanisme *homing* ini memfokuskan pada konsep bahwa aktifitas sistim mukosal untuk mukosa dan terjadi di mukosa, dalam arti bahwa ia dapat membatasi dan memfokuskan respons imun mukosa pada jaringan mukosa.

Limfoblast B muda yang dibentuk di kelenjar limfe dari usus atau kelenjar limfa bronkus, secara selektif menempati daerah mukosa, sebagian besar terdiri dari sel B IgA (70% - 90%). Sedangkan limfoblast T muda dari kelenjar limfe usus dan duktus torasikus, akan menempati daerah mukosa usus, baik sebagai IEL maupun sebagai LPL, walaupun jika dibanding dengan sel B kemampuan ini lebih kecil.

Penghunian mukosa bukan merupakan mekanisme *antigen trapping*. Limfoblast yang berasal dari folikel bermigrasi ke mukosa yang bebas imunogen. Tantangan imunogen di tempat tertentu di mukosa menyebabkan limfosit reaktif terhadap imunogen, baik di tempat kejadian maupun di luar tempat kejadian di mukosa dalam proporsi yang seimbang. Selanjutnya sel bermigrasi ke lamina propria, tetapi keberadaan imunogen tersebut tidak menyebabkan sel tersebut menetap dan berproliferasi di tempat tersebut.

Mekanisme *mucosal homing* dimulai oleh adanya interaksi antara berbagai reseptor spesifik *homing*, yang terdapat pada limfosit di dalam *Peyer's patch* dan ligan untuk berbagai reseptor di sel endotel. Interaksi ini melibatkan berbagai molekul, seperti *adressin*, CD 44, dan *integrine*. Interaksi reseptor dan molekulnya akan diikuti oleh adanya penetrasi limfosit pada endotel, dan selanjutnya limfosit akan masuk ke jaringan mukosa yang lebih aman. Kemampuan *homing* limfosit *Peyer's patches* ke lamina propria dapat dijelaskan melalui induksi selektif dari reseptor *homing* pada limfosit di daerah tersebut.

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL
DAN
HIPOTESIS PENELITIAN

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Benzopirin merupakan senyawa polisiklik aromatis hidrokarbon, bersifat imunotoksik dan immunosupresif, berpotensi menghambat perkembangan berbagai sel imunokompeten, terutama limfopoesis dari sel T dan sel B. Mampu menghambat aktivitas sel *T helper*, dapat menurunkan respons sel T serta mampu menekan imunitas yang diperantarai sel (Davila,1996). Di samping bersifat imunotoksik dan immunosupresif, benzopirin juga bersifat karsinogenik yang dapat menyebabkan terbentuknya kanker pada berbagai organ tubuh.

Senyawa benzopirin dapat memasuki tubuh melalui berbagai cara antara lain : melalui saluran pencernaan makanan, saluran pernafasan serviks dan kulit. Pada saluran pencernaan makanan senyawa benzopirin yang merupakan antigen dan imunogen, diserap oleh sel epitel mukosa usus dan sel M, selanjutnya dilepas ke area sub epitelial, memasuki *dome area* dari jaringan limfoid terorganisasi. Di dalam sel epitel dan sel imunokompeten, senyawa benzopirin berikatan secara kovalen dengan guanin dari DNA, yang mengakibatkan terjadinya gangguan pada fungsi sel. Pada sel epitel mukosa ileum, gangguan fungsi sel dapat menyebabkan terjadinya mutasi sel, yang selanjutnya dapat menyebabkan terbentuknya sel kanker pada mukosa usus. Sedangkan pada sel imunokompeten, gangguan fungsi sel dapat menyebabkan

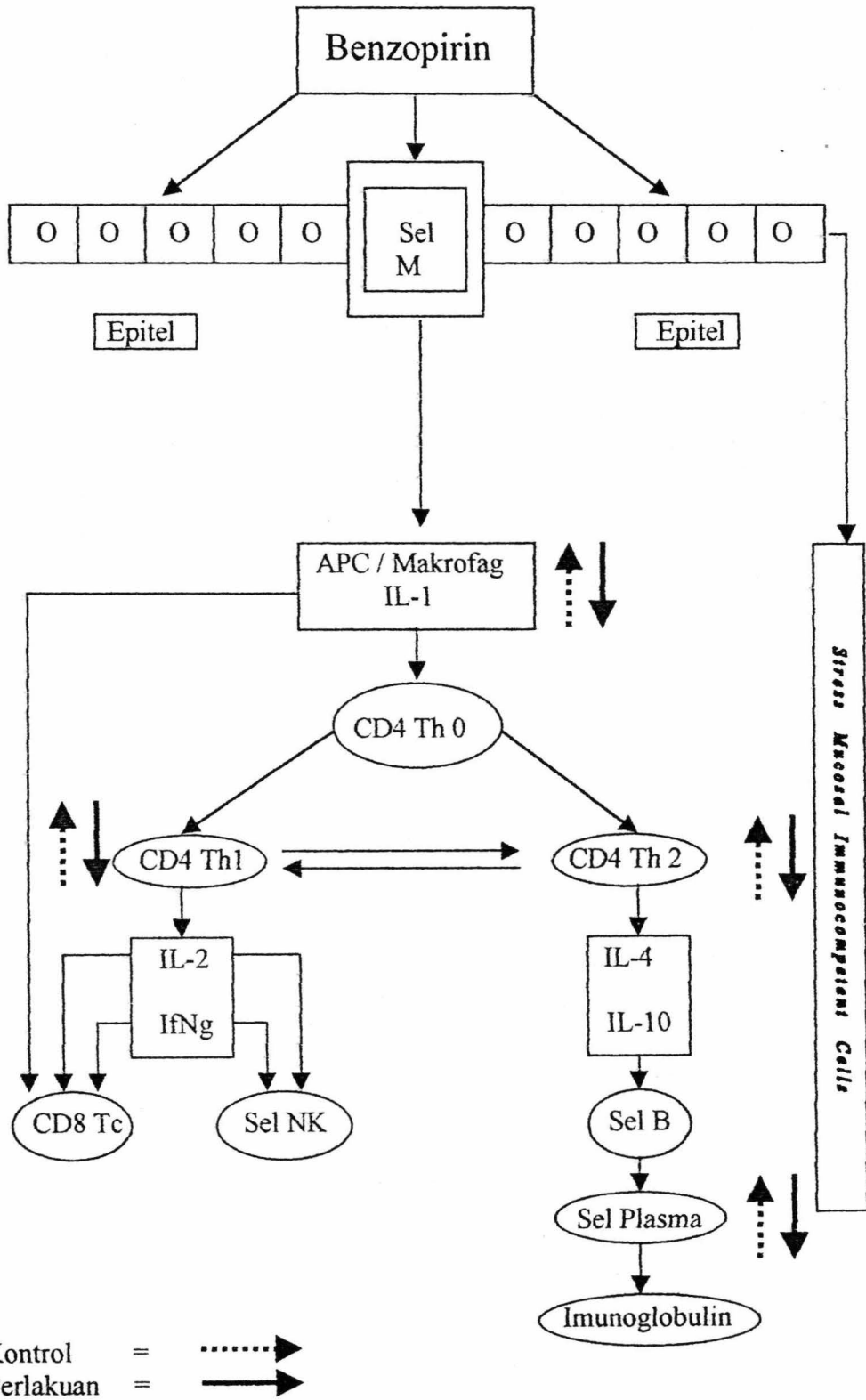
terjadinya penekanan limfopoesis dan penurunan produk interleukin 1 (IL-1) oleh makrofag. Penurunan produk IL-1 oleh makrofag mengakibatkan terjadinya hambatan pada aktifitas sel T *helper* dan hambatan proliferasi sel B menjadi sel plasma dan aktifitas sel plasma menjadi sel plasma aktif.

Bagan kerangka konseptual penelitian yang diajukan berdasarkan landasan teoritis dan landasan empiris disajikan pada gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian tersebut di atas, merupakan pegangan dan pengarahan untuk melakukan penelitian, yang menggunakan paradigma patobiologik sistim imun mukosal yang berkonsep pada stres sel imunokompeten. Paradigma patobiologik adalah model berfikir yang didasarkan pada perubahan biologik, yang merugikan sebagai akibat dari interaksi antara individu dan lingkungannya. Dalam hal ini pengertian individu termasuk juga individu sel, yang mengadakan interaksi dengan lingkungannya. Pengertian konsep stres sel yang dimaksud adalah, adanya interaksional dan transaksional antara sel dan lingkungannya. Sel imunokompeten akan mengalami stres sebagai akibat dari paparan benzopirin yang menyebabkan gangguan fungsi sel, sehingga sel tersebut akan mengalami perubahan perilaku utamanya yang terjadi pada makrofag, dengan akibat terjadinya penurunan respons imun mukosa yang dilaksanakan oleh sel imunokompeten.

Untuk mendapatkan variabel yang bersumber dari kerangka konseptual penelitian, digunakan rancangan eksperimental sesungguhnya dengan jenis penelitian faktorial.

Untuk mengempirkan variabel yang ada pada kerangka konseptual menjadi data penelitian yang dapat dianalisis, digunakan prosedur pewarnaan variabel dengan menggunakan metode pewarnaan hematoksilin eosin (HE) dan metode pewarnaan diastase periodic acid schift (d PAS), yang mendasarkan pada konsep morfofungsi (Putra, 1997).

Untuk melihat penurunan respons imun yang terjadi pada mukosa ileum mencit, maka perlu dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, antara perlakuan dosis dan waktu paparan serta interaksi antara dosis dan waktu paparan.



Gambar 3.1. Bagan kerangka konseptual penelitian



3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual penelitian tersebut di atas, pada penelitian ini diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut.

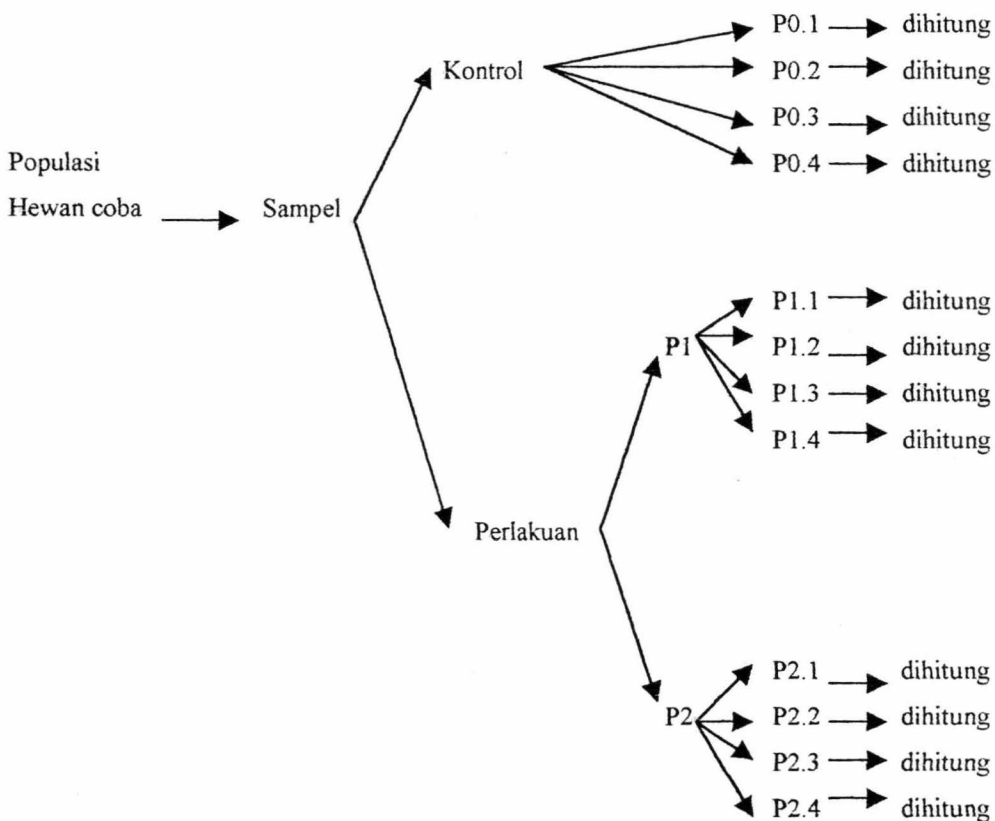
1. Paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda dapat menurunkan jumlah limfosit pada mukosa ileum mencit.
2. Paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda dapat menurunkan jumlah makrofag pada mukosa ileum mencit.
3. Paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda dapat menurunkan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum mencit.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental sesungguhnya (*True experimental*), yang dilakukan di laboratorium, dengan menggunakan rancangan penelitian faktorial $3 \times 4 \times 3$ (Sarmanu, 1993). Secara diagramatis, rancangan penelitian dapat digambarkan alurnya sebagai berikut.



Gambar 4.1. Skema rancangan penelitian

Faktor A . Waktu paparan larutan benzopirin , yaitu :

- 1 : setiap minggu dua kali paparan selama 1 minggu
- 2 : setiap minggu dua kali paparan selama 2 minggu
- 3 : setiap minggu dua kali paparan selama 4 minggu
- 4 : setiap minggu dua kali paparan selama 8 minggu

Faktor B . Dosis paparan larutan benzopirin yang terdiri dari :

- P0 : minyak olivarum tanpa larutan benzopirin
- P1 : larutan benzopirin 10 mg/kg berat badan
- P2 : larutan benzopirin 20 mg/ kg berat badan

Interaksi Perlakuan

P0.1	P1.1	P2.1
P0.2	P1.2	P2.2
P0.3	P1.3	P2.3
P0.4	P1.4	P2.4

4.2 Sampel dan Besar Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan strein BALB/C berusia 8 minggu, dengan berat badan awal antara 20-25 gr, yang diperoleh dari fakultas Farmasi Unair. Besar sampel minimal yang

dipergunakan untuk pengujian hipotesis penelitian, ditentukan dengan rumus.

Higgins dan klinbaum (Sudiana, 1995) , dan Pudjiraharjo (1996).

$$n_i = \frac{1}{1-f} \frac{2 (Z_a + Z_b)^2 \cdot S^2}{(X_c - X_t)}$$

Dimana :

- ni : Jumlah sampel
 Xc : Nilai rerata kelompok kontrol
 Xt : Nilai rerata kelompok perlakuan
 S : Simpangan baku kelompok kontrol
 Za (5%) : 1,96
 Zb (10%) : 1,28
 f : Proporsi kegagalan

Dari hasil penelitian pendahuluan dengan menggunakan rumus tersebut di atas(Higgins, Klinsbaum,1985) dan Pudjiraharjo,1996, besar sampel minimal yang seharusnya digunakan dalam penelitian ini adalah 8 ekor mencit untuk variabel sel plasma dan 6 ekor mencit untuk variabel limfosit. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan tersebut dan dari data empiris penelitian sebelumnya (Husen,1998), pada penelitian ini tiap kelompok perlakuan digunakan 12 ekor mencit yang dibagi dalam 4 sub kelompok, masing-masing sub kelompok terdiri dari 3 ekor mencit.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Dosis, waktu serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan larutan benzopirin

Variabel kendali : Jenis kelamin, strain dan umur mencit, makanan dan minuman mencit, perawatan dan sanitasi kandang pemeliharaan.

Variabel terikat : Jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif pada mukosa ileum mencit.

4.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Respons imun mukosa usus adalah suatu tanggapan ketahanan imunologik yang terjadi pada mukosa ileum mencit terhadap imunogen benzopirin. Respons imun ini terdiri atas dua tahap, yaitu proses pengenalan imunogen dan reaksi untuk mengeliminasi imunogen tersebut (Roitt,1996). Respons imun mukosal pada ileum mencit akibat paparan benzopirin diupayakan dapat mencerminkan konsep imunopatobiologik (Putra,1997).

Adapun rincian definisi operasional variabel yang ditetapkan adalah sebagai berikut.

1. limfosit, merupakan komponen imunologik mukosa ileum yang mempunyai kemampuan untuk mengenal dan berinteraksi dengan imunogen benzopirin (sel imunokompeten), dengan karakteristik mempunyai inti dengan lipatan membran dalam yang tidak teratur, anak

inti tidak tampak, dengan sitoplasma bervariasi mulai dari eosinofilik sampai basifilik, mempunyai berbagai molekul khusus pada membran sel yang disebut dengan reseptor antigen, yang berkemampuan mengenal dan berinteraksi dengan epitop (Soeparto,1997) .

2. Makrofag, adalah komponen sistim imunologik mukosa ileum yang mempunyai kemampuan sebagai *antigen presenting cell* , dengan karakteristik ukuran sel antara 10 – 30 mikron, inti sel berbentuk ginjal terletak eksentrik, memiliki 3 lapis membran sel dengan banyak penonjolan dan invaginasi, sitoplasma mengandung retikulum endoplasmik dengan atau tanpa ribosom, lisosom dalam jumlah yang banyak tersebar dalam sitoplasma, dalam keadaan aktif terdapat banyak vakuola (Soeparto,1997) .
3. Sel Plasma aktif, merupakan hasil proliferasi dan deferensiasi dari sel B yang terpacu oleh antigen atau imunogen, dengan aktif memproduksi imunoglobulin untuk mengenal dan mengikat antigen atau imunogen, merupakan unsur utama dalam *immune excludion*, dengan karakteristik mempunyai inti bulat, dengan susunan kromatin seperti roda pedati, inti terletak eksentrik di dalam sitoplasma, sitoplasma relatif sedikit jika dibandingkan dengan besarnya inti. Dengan teknik pewarnaan diastase periodic acid schiff, memberikan hasil sitoplasma berwarna merah margenta (Putra, 1984; Soeparto,1997) .

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan penelitian

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Benzo (a) pyrene buatan SIGMA, dilarutkan dengan minyak olivarum buatan SIGMA sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Garam fisiologis (NaCl 0,9%), buffer formalin 10%, etanol 96% dan etanol absolut, xylol, parafin, asam asetat glasial, aquadest, entellan, PBS, larutan diastase 0,1%, periodic acid 0,5%, schiff, H Cl pekat, amonium hidroksida 28%, gliserin, albumin, hematoksilin dan eosin .

4.5.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kandang mencit yang terbuat dari bak plastik berisi sekam, ditutup dengan kawat kasa, dilengkapi dengan tempat makan dan botol minum, spet dengan jarum yang ditumpulkan, seperangkat alat bedah, botol jam, mikrotom putar dan perlengkapannya, water bath, gelas obyek dan gelas penutup, oven, termometer, bak plastik, kertas label, mikroskop sinar binokuler, grateculae, counter, pensil dan tabel ompong.

4.5.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Medisinal Fakultas MIPA, laboratorium Patologi Anatomi dan laboratorium Gramik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, pada bulan Januari sampai dengan bulan Juli 1999.

4.6 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

1. Dari populasi hewan coba sebanyak 36 ekor mencit jantan strain BALB/C, diadaptasikan dengan kondisi lingkungan selama minggu, dibagi secara random menjadi tiga kelompok berdasarkan dosis paparan benzopirin yang diberikan, yaitu kelompok kontrol, perlakuan 1, dan perlakuan 2, selanjutnya tiap kelompok dibagi lagi menjadi 4 sub kelompok berdasarkan waktu paparan larutan benzopirin. Pembagian kelompok dan sub kelompok diatur sebagai berikut :

Kelompok P0.1 : Kelompok kontrol 1, dimana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 ml minyak olivarium per oral dua kali dalam seminggu selama 1 minggu

Kelompok P0.2: Kelompok kontrol 2, dimana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 ml minyak olivarium per oral dua kali dalam seminggu selama 2 minggu

Kelompok P0.3 : Kelompok kontrol 3, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 ml minyak olivarium per oral dua kali dalam seminggu selama 4 minggu

Kelompok P0.4 : Kelompok kontrol 4, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 ml minyak olivarium per oral dua kali dalam seminggu selama 8 minggu.

Kelompok P1.1 : Kelompok perlakuan 1.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0, 2 ml larutan benzopirin per oral 10 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 1 minggu.

Kelompok P1.2 : Kelompok perlakuan 1.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0, 2 ml larutan benzopirin per oral 10 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 2 minggu.

Kelompok P1.3 : Kelompok perlakuan 1.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0, 2 ml larutan benzopirin per oral 10 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 4 minggu.

Kelompok P1.4 : Kelompok perlakuan 1.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0, 2 ml larutan benzopirin per oral 10 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 8 minggu.

Kelompok P2.1 : Kelompok perlakuan 2.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 larutan benzopirin per oral 20 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 1 minggu.

Kelompok P2.2 : Kelompok perlakuan 2.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 larutan benzopirin per oral 20 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 2 minggu.

Kelompok P2.3 : Kelompok perlakuan 2.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 larutan benzopirin per oral 20 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 4 minggu.

Kelompok P2.4 : Kelompok perlakuan 2.1, di mana 3 ekor mencit masing-masing diberi 0,2 larutan benzopirin per oral 20 mg/kg berat badan 2 kali dalam seminggu selama 8 minggu.

2. Setiap satu ekor mencit ditimbang berat badannya, dan dimasukkan dalam kandang pemeliharaan. Berat badan hasil penimbangan digunakan sebagai dasar pembuatan larutan benzopirin yang diberikan sebagai perlakuan.
3. Setiap mencit diberi pakan berupa pelet Par G 521, produksi PT. Japfa Comfeed Indonesia yang mengandung protein 15-16%, lemak 4-6%, serat 5-6%, Ca 0,0-1, 1%, P 0, 6-0, 8% dan abu 5-7%. Air minum yang diberikan adalah aquadest yang diberikan ad libitum
4. Perlakuan terhadap mencit berupa paparan larutan benzopirin per oral sesuai dengan dosis dan waktu paparan yang telah ditentukan.
5. Pada akhir minggu yang telah ditentukan, masing-masing mencit dikorbankan dengan metode *single fixatif*, kemudian mencit dibedah dan

diambil jaringan usus bagian ileum untuk dipersiapkan sebagai sediaan dan diwarnai dengan metode pewarnaan HE (hematoksilin eosin) dan metode pewarnaan diastase-PAS (*Periodic Acid Schiff*)

6. Pewarnaan jaringan sediaan dilakukan dengan prioritas sebagai berikut :
 1. Limfosit dan makrofag dilakukan pewarnaan dengan metode HE.
 2. Sel plasma aktif dilakukan pewarnaan dengan metode diastase-PAS (periodic acid schiff)

4.7 Prosedur Pembuatan Sediaan Histopatologi Mukosa Ileum

Mencit yang telah dikorbkan diambil irisan usus pada bagian ileum, dengan jarak 1 cm dari usus buntu. Panjang irisan kurang lebih 1 Cm. Jaringan segar yang didapat sebagian disimpan di dalam kontainer yang mengandung nitrogen cair dengan suhu - 190⁰ C, untuk dibuat cadangan, sebagian yang lain difiksasi dengan buffer formalin 10%, selanjutnya dibuat sediaan dengan metode parafin. Setelah jaringan difiksasi dengan buffer formalin 10% selama 24 jam, selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan menggunakan etanol 70%, 80%, 90%, 96% dan 100%. Kemudian dilakukan proses penjernihan (clearing) dengan menggunakan larutan xylol, dan dilakukan impregnasi dengan menggunakan parafin cair, selanjutnya dilakukan embedding di dalam blok parafin, selanjutnya dilakukan pemotongan (*sectioning*) dengan menggunakan mikrotom putar, kemudian dilakukan pewarnaan sesuai dengan metode pewarnaan yang telah ditetapkan.

4.8 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh dosis paparan benzopirin, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan benzopirin terhadap penurunan respon imun mukosa ileum mencit, dilakukan pengumpulan data dengan cara mengamati dan menghitung jumlah limfosit, makrofag, dan sel plasma aktif per lapang pandang pada mukosa ileum mencit, tiap sediaan ileum mencit diamati sebanyak 4 kali lapang pandang sesuai dengan arah jarum jam yaitu jam 3, jam 6, jam 9 dan jam 12 dengan menggunakan *grateculae* yang terpasang pada lensa okuler dari mikroskop. Dari 4 kali lapang pandang pengamatan dan penghitungan, selanjutnya dibuat rerata hasil penghitungan, untuk selanjutnya dilakukan analisis data hasil penelitian. Untuk menguji hipotesis yang diajukan, data dianalisis dengan uji anava (Analisis varians) faktorial dua arah (Sarmanu,1993,). Apabila perlakuan dosis, waktu serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan berpengaruh nyata (signifikans), maka analisis dilanjutkan dengan uji t, untuk mengetahui perbedaan rerata antar perlakuan. Hasil uji t bermakna bila diperoleh harga $p < 0,05$ (Sarmanu,1999; Sudjana, 1995).

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

Pemeriksaan terhadap variabel respons imun mukosa ileum mencit, dilakukan dengan cara membaca dan menghitung unit analisis pada mikroskop sinar yang meliputi jumlah limfosit, makrofag, dan sel plasma aktif per lapang pandang, pada sediaan histopatologik sesuai dengan pewarnaan yang dilakukan. Setiap satu sampel penelitian dilakukan pembacaan dan penghitungan unit analisis sebanyak 4 kali lapang pandang, sesuai dengan arah jarum jam pada jam 3, jam 6, jam 9 dan jam 12, dengan menggunakan *grateculae* pada perbesaran 400 x.

Data hasil pembacaan dan penghitungan terhadap jumlah variabel respons imun, pada mukosa ileum mencit berdasarkan dosis, waktu paparan dan kombinasi antara dosis dan waktu paparan benzopirin yang diberikan, disajikan sebagai berikut.

5.1.1. Data jumlah limfosit

Data hasil pembacaan dan penghitungan jumlah limfosit pada mukosa ileum mencit per lapang pandang disusun pada lampiran 8. Sedangkan rerata hasil pembacaan dan penghitungannya disajikan pada tabel 5.1, 5.2, 5.3,

dengan klasifikasi A = waktu paparan, B = dosis paparan serta AB adalah kombinasi antara dosis dan waktu paparan, serta gambar 5.1 dan 5.2.

Tabel 5.1. Rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin dosis 0, 10 dan 20 mg/kg berat badan

	Dosis benzopirin (mg/kg BB)		
	0	10	20
Rerata jumlah limfosit	10,354 ^a	8,396 ^b	7,063 ^c
Simpangan baku	1,670	2,252	2,054

Nilai rerata pada baris sama yang diikuti dengan superskrip berbeda, berbeda nyata ($P < 0,05$).

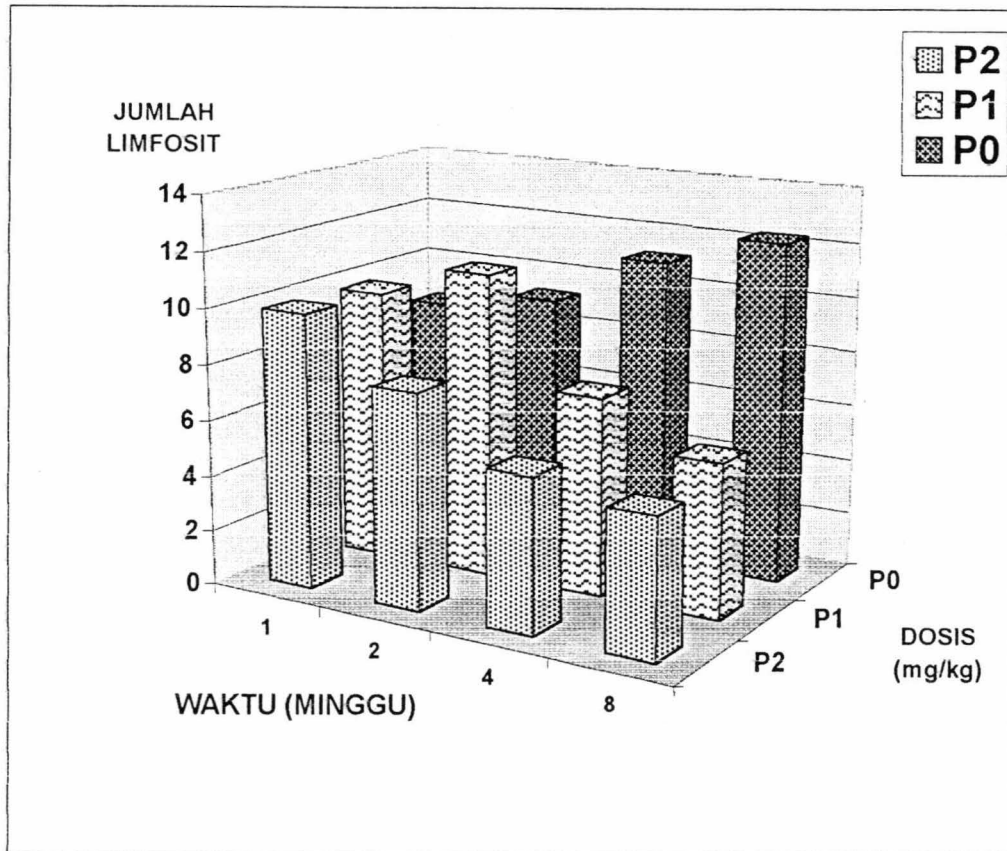
Tabel 5.2. Rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin selama 1, 2, 4, dan 8 minggu

	Waktu paparan (minggu)			
	1	2	4	8
Rerata jumlah limfosit	9,444 ^a	9,361 ^a	7,972 ^b	7,639 ^b
Simpangan baku	0,748	1,562	2,520	3,542

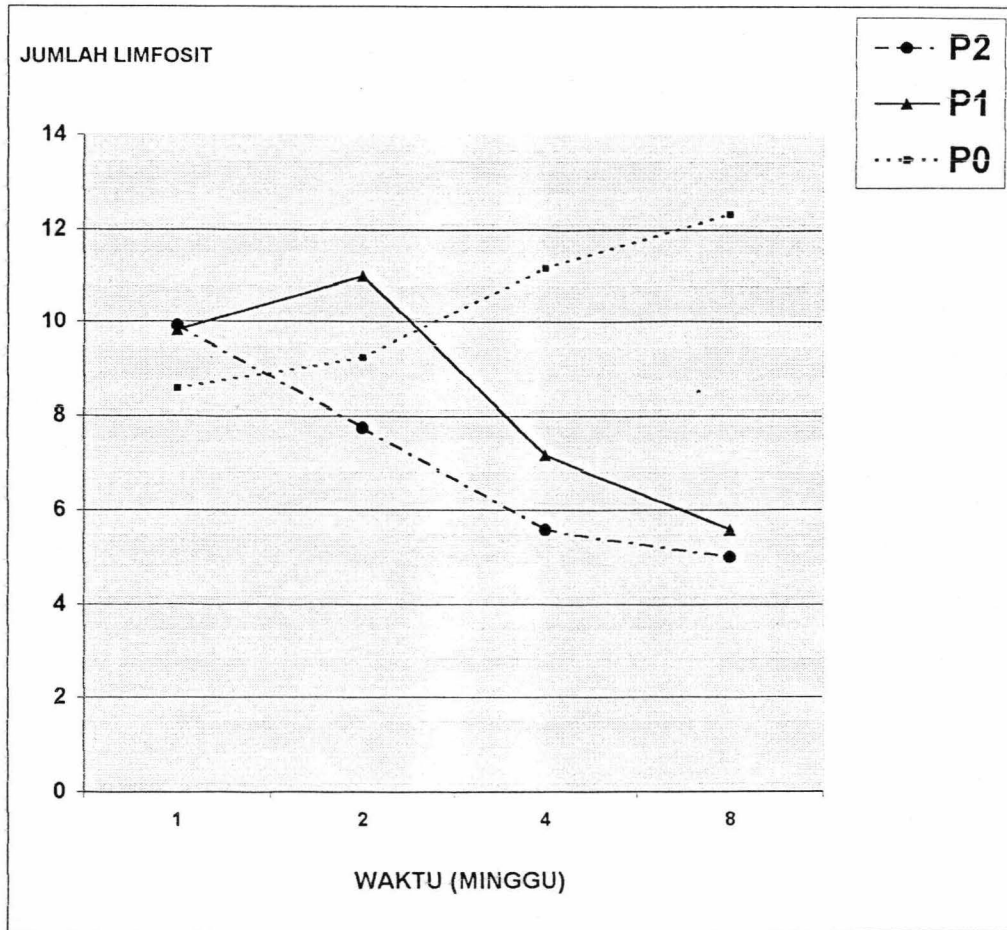
Nilai rerata pada baris sama yang diikuti dengan superscrip sama, tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), sedangkan yang diikuti superscrip berbeda, berbeda nyata ($P < 0,05$).

Tabel 5.3. Rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit dengan kombinasi dosis dan waktu paparan benzopirin

Kombinasi dosis dan waktu paparan	Rerata jumlah limfosit	Simpangan baku
A1B1	8,583	0,520
A1B2	9,833	0,382
A1B3	9,917	0,382
A2B1	9,333	1,233
A2B2	11,000	0,250
A2B3	7,750	0,500
A3B1	11,167	0,520
A3B2	7,167	0,382
A3B3	5,583	0,382
A4B1	12,333	0,382
A4B2	5,583	0,382
A4B3	5,000	0,250
Total	8,604	2,383



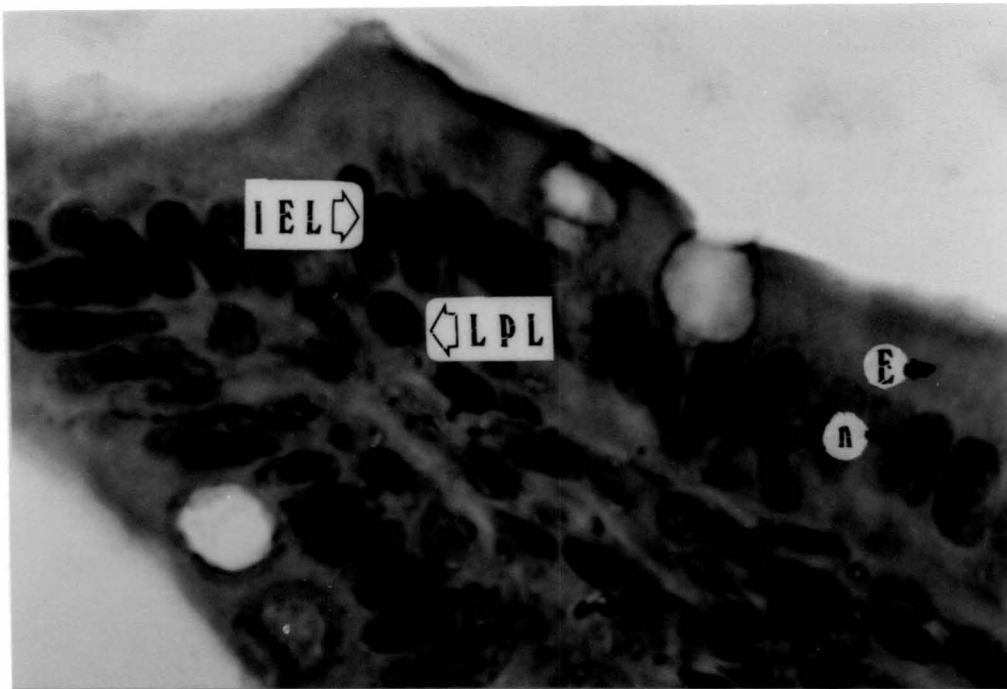
Gambar 5.1. Histogram rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin dengan dosis P0 = kontrol, P1 = 10 mg/kg, P2 = 20 mg/kg. Waktu paparan : 1 minggu ; 2 minggu ; 4 minggu dan 8 minggu



Gambar 5.2. Grafik rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin dengan dosis P0 = kontrol, P1 = 10 mg/kg, P2 = 20 mg/kg. Waktu paparan : 1 minggu ; 2 minggu ; 4 minggu dan 8 minggu

Dari tabel 5.1, dan 5.2 terlihat bahwa rerata jumlah limfosit pada paparan dosis dan waktu paparan yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 10 mg/kg berat badan dan perlakuan 20 mg/kg berat badan. Sedangkan dari tabel 5.3 dan dari gambar 5.1 dan gambar 5.2 terlihat bahwa rerata jumlah limfosit kelompok kontrol (0 mg/kg) mengalami peningkatan jumlah seiring dengan bertambahnya usia mencit dari $(8,58 \pm 0,52)$ pada usia 2 bulan lebih satu minggu, menjadi $(12,33 \pm 0,38)$ pada usia 4 bulan lebih satu minggu pada saat pembedahan. Sedangkan untuk rerata jumlah limfosit pada kelompok perlakuan I (10 mg/kg) terlihat bahwa jumlah limfosit mengalami peningkatan untuk waktu paparan 1 dan 2 minggu, di mana rerata jumlah limfosit melebihi rerata jumlah kontrolnya, sedangkan untuk waktu paparan 4 dan 8 minggu jumlah limfosit mengalami penurunan. Untuk kelompok perlakuan II (20 mg/kg) terlihat bahwa jumlah limfosit pada waktu paparan 1 minggu mengalami peningkatan jika dibanding dengan kontrolnya, sedangkan untuk paparan 2, 4 dan 8 minggu mengalami penurunan jumlah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan I (10 mg/kg berat badan).

Gambar limfosit pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit disajikan pada gambar 5.3.



Gambar 5.3. Limfosit pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit

Perlakuan : Benzopirin
Penampang : Melintang
Tabel Irisan : 5 μ
Pewarnaan : Hematoksilin eosin
Perbesaran : 1000 x
Keterangan :

E = sel epitel
n = inti sel epitel
IEL = *intra epithelial lymphocyte*
LPL = *lamina propria lymphocyte*

5.1.2. Data jumlah makrofag

Pembacaan dan penghitungan jumlah makrofag pada mukosa ileum mencit dilakukan dengan cara membaca, memilih dan menghitung, jumlah makrofag yang terpotong melintang atau membujur, intinya jelas tampak seperti ginjal, sitoplasma berbusa dan terdapat vakuola. Data hasil pembacaan dan penghitungan jumlah makrofag, pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol per lapang pandang disajikan pada lampiran 2. Sedangkan rerata hasil pembacaan dan penghitungannya disajikan pada tabel 5.4, 5.5, 5.6, dengan klasifikasi A = waktu paparan, B = dosis paparan, AB adalah kombinasi antara dosis dan waktu paparan, serta gambar 5.4 dan 5.5.

Tabel 5.4. Rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin dosis 0, 10 dan 20 mg/kg berat badan

	Dosis benzopirin (mg/kg BB)		
	0	10	20
Rerata jumlah makrofag	4,417 a	4,125 a	3,938 a
Simpangan baku	1,052	0,889	1,192

Nilai rerata pada baris sama yang diikuti dengan superscrip sama, tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

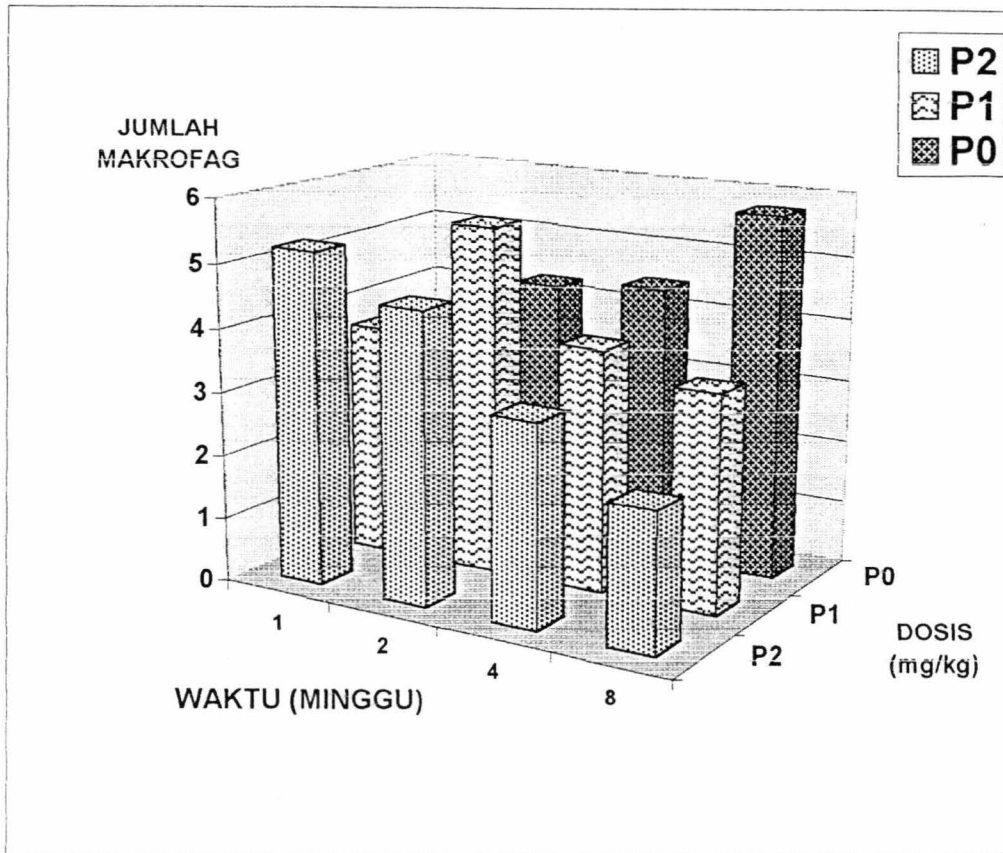
Tabel 5.5. Rerata jumlah makrofag mukosa ileum menciit yang diberi paparan benzopirin selama 1, 2, 4, dan 8 minggu

	Waktu paparan (minggu)			
	1	2	4	8
Rerata jumlah makrofag	4,056 a	4,778 b	3,806 a	4,000 a
Simpangan baku	1,044	0,805	0,716	1,369

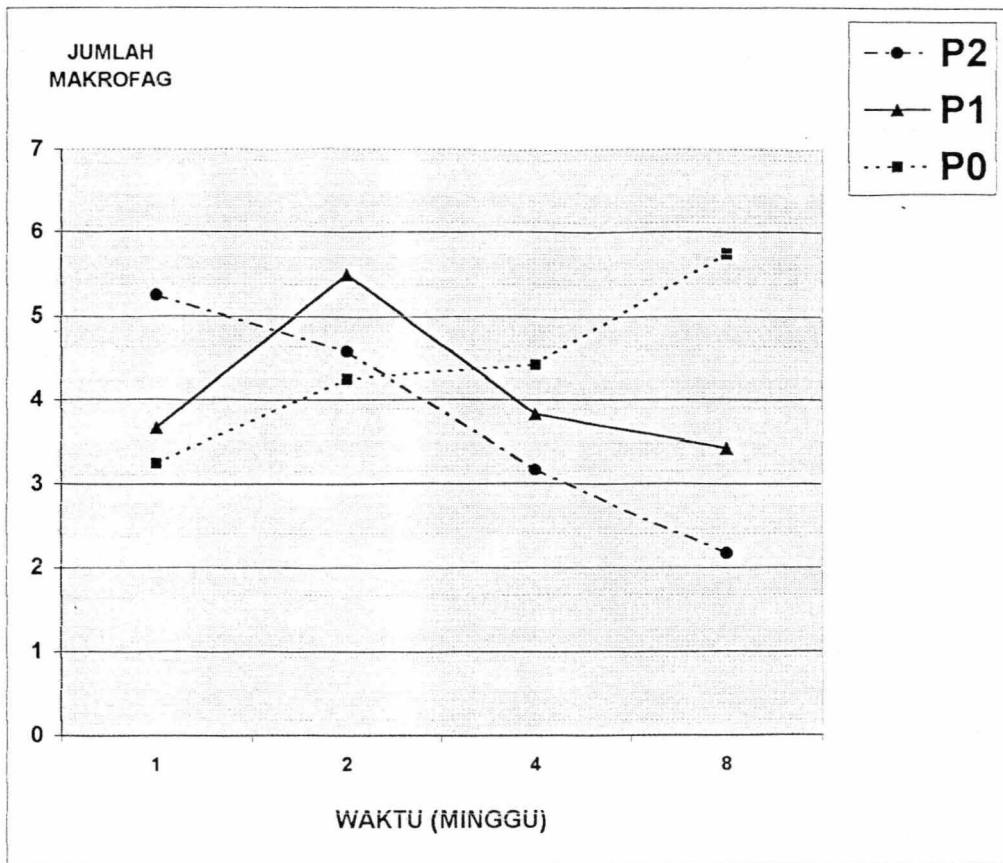
Nilai rerata pada baris sama yang diikuti dengan superscrip sama, tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), sedangkan yang diikuti superscrip berbeda, berbeda nyata ($P < 0,05$).

Tabel 5.6. Rerata jumlah makrofag mukosa ileum menciit dengan kombinasi dosis dan waktu paparan benzopirin

Kombinasi dosis dan waktu paparan	Rerata jumlah makrofag	Simpangan baku
A1B1	3,250	0,250
A1B2	3,667	0,382
A1B3	5,250	0,901
A2B1	4,250	0,661
A2B2	5,500	0,500
A2B3	4,583	0,804
A3B1	4,417	0,878
A3B2	3,833	0,144
A3B3	3,167	0,289
A4B1	5,750	0,250
A4B2	3,500	0,250
A4B3	2,750	0,250
Total	4,160	1,041

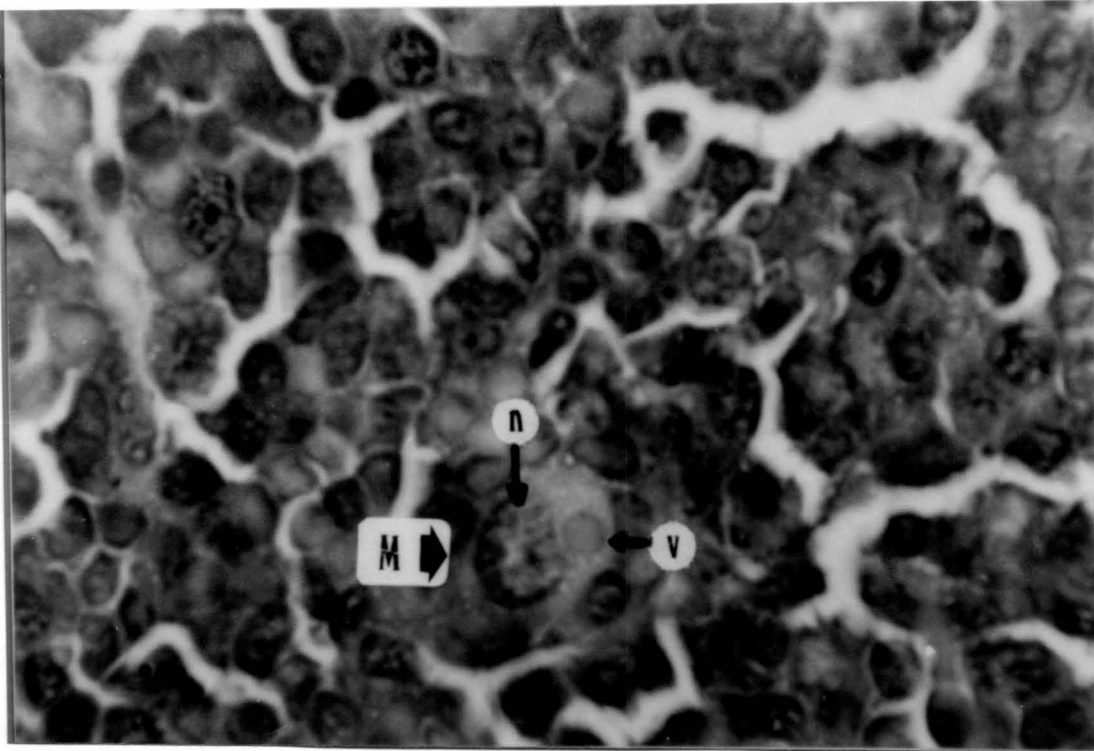


Gambar 5.4. Histogram rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin dengan dosis 0 = kontrol, 1 = 10 mg.kg, 2 = 20 mg/kg. Waktu paparan : 1 minggu : 2 minggu : 4 minggu : 8 minggu



Gambar 5.5. Grafik rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin dengan dosis P0 = kontrol, P1 = 10 mg.kg, P2 = 20 mg/kg. Waktu paparan : 1 minggu ; 2 minggu ; 4 minggu ; Dan 8 minggu

Dari tabel 5.4 tersebut di atas, terlihat bahwa rerata jumlah makrofag pada paparan benzopirin dengan dosis yang berbeda, rerata jumlah makrofag tidak menunjukkan adanya perbedaan antara kelompok kontrol, perlakuan 10 mg/kg BB dan 20 mg/kgBB . Sedangkan dari tabel 5.5 untuk perlakuan dengan waktu paparan yang berbeda, tampak adanya perbedaan antara waktu paparan 1 dengan 2 minggu, sedangkan antara 1 dengan 4 dan 8 minggu, rerata jumlah limfosit tidak menunjukkan adanya perbedaan . Sedangkan dari tabel 5.6 serta gambar 5.4 dan 5.5, terlihat bahwa rerata jumlah makrofag pada mukosa ileum mencit untuk kelompok kontrol menunjukkan adanya peningkatan jumlah, tetapi apabila dilihat dari pertumbuhan usia dari 2 bulan (pada paparan 1 minggu) sampai dengan usia 4 bulan (pada paparan 8 minggu) peningkatan tersebut tampak kurang signifikan (hasil uji t 0,05). Untuk rerata jumlah makrofag pada kelompok perlakuan I (10 mg/kg BB), tampak bahwa jumlah makrofag mengalami peningkatan pada paparan 1 dan 2 minggu jika dibandingkan dengan kontrolnya, sedangkan untuk waktu paparan 4 dan 8 minggu jumlah makrofag mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan I. Sedangkan pada dosis dan waktu paparan yang tinggi (20 mg/kg BB) selama 4 dan 8 minggu, benzopirin dapat menekan jumlah makrofag yang terbaca secara bermakna. Gambar makrofag pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit disajikan dalam gambar 5.6.



Gambar 5.6. Makrofag pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit

Perlakuan : Benzopirin
 Penampang : Melintang
 Tebal irisan : 5 μ
 Pewarnaan : Hematoksilin, Eosin
 Perbesaran : 1000 x
 Keterangan :

SM = sel M
 M = makrofag
 n = inti makrofag
 v = vakuola aktif



5.1.3. Data jumlah sel plasma aktif

Pembacaan dan penghitungan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum menciit, dilakukan dengan cara memilih, membaca dan menghitung sel plasma aktif yang terpotong melintang atau membujur dengan tanda inti sel eksentrik, sitoplasma berwarna merah margenta dengan retikulum endoplasmik kasar yang cukup jelas. Data hasil pembacaan dan penghitungan jumlah sel plasma aktif pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, per lapang pandang disajikan pada lampiran 3, sedangkan rerata hasil pembacaan dan penghitungannya disajikan pada tabel 5.7, 5.8, 5.9, dengan klasifikasi A = waktu paparan, B = dosis paparan serta AB adalah kombinasi antara dosis dan waktu paparan, serta gambar 5.7 dan 5.8.

Tabel 5.7. Rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum menciit yang diberi paparan benzopirin dengan dosis 0, 10 dan 20 mg/kg berat badan

	Dosis benzopirin (mg/kg BB)		
	0	10	20
Rerata jumlah sel plasma aktif	4,688 a	4,250 b	3,479 c
Simpangan baku	0,995	0,923	0,686

Nilai rerata pada baris sama yang diikuti dengan superskrip berbeda, berbeda nyata ($P < 0,05$).

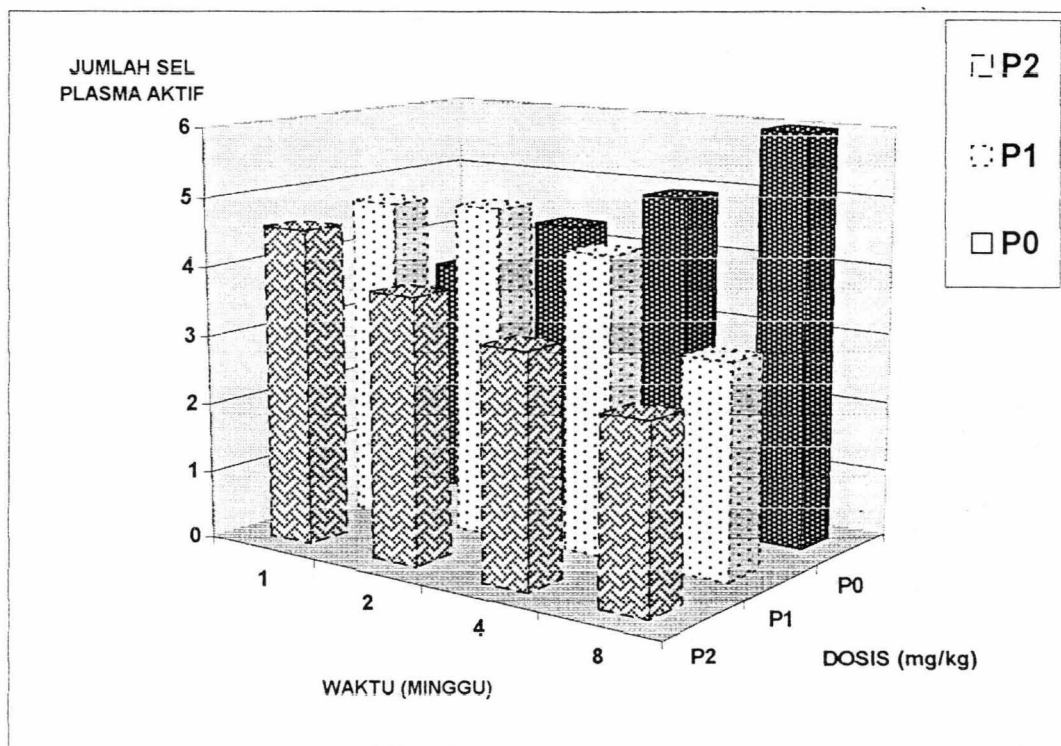
Tabel 5.8. Rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit yang diberi paparan benzopirin selama 1, 2, 4, dan 8 minggu

	Waktu paparan (minggu)			
	1	2	4	8
Rerata jumlah sel plasma aktif	4,111 a	4,333 a	4,194 a	3,917 a
Simpangan baku	0,626	0,586	0,966	1,591

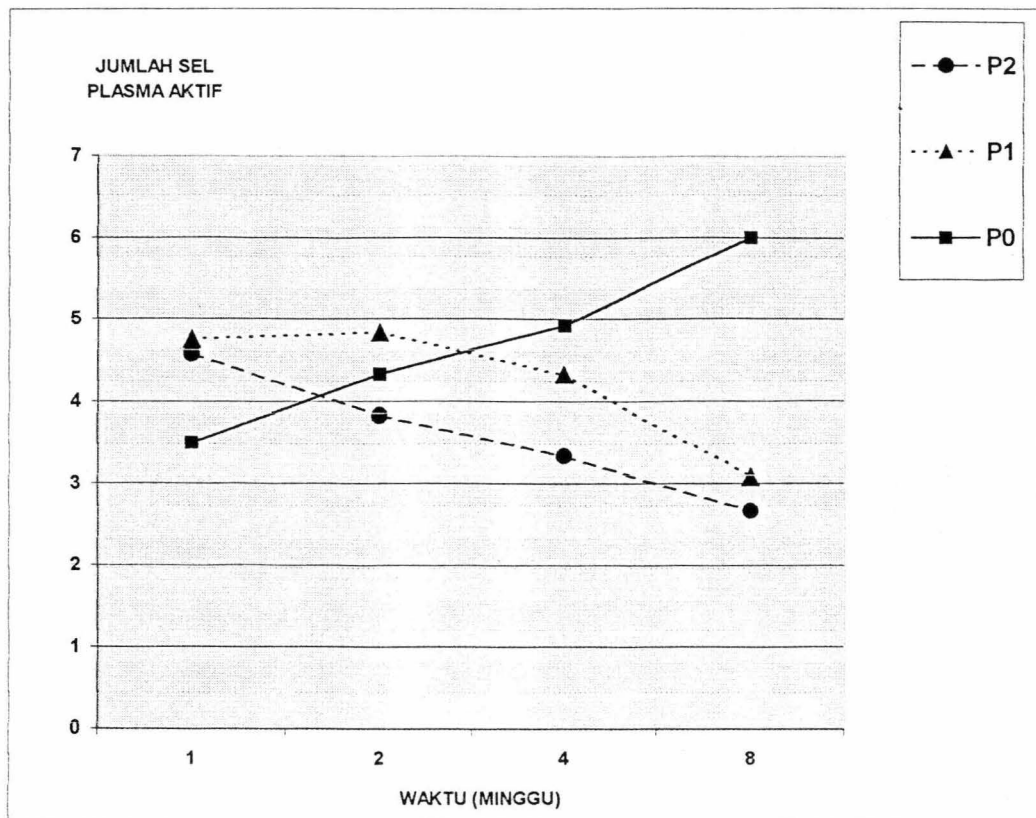
Nilai rerata pada baris sama yang diikuti dengan superscrip sama, tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

Tabel 5.9. Rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit dengan kombinasi dosis dan waktu paparan benzopirin

Kombinasi dosis dan waktu paparan	Rerata jumlah sel plasma aktif	Simpangan baku
A1B1	3,500	0,250
A1B2	4,750	0,250
A1B3	4,083	0,520
A2B1	4,333	0,144
A2B2	4,833	0,520
A2B3	3,833	0,577
A3B1	4,917	1,577
A3B2	4,333	0,181
A3B3	3,333	0,289
A4B1	6,000	0,250
A4B2	3,083	0,144
A4B3	2,667	0,382
Total	4,139	0,992

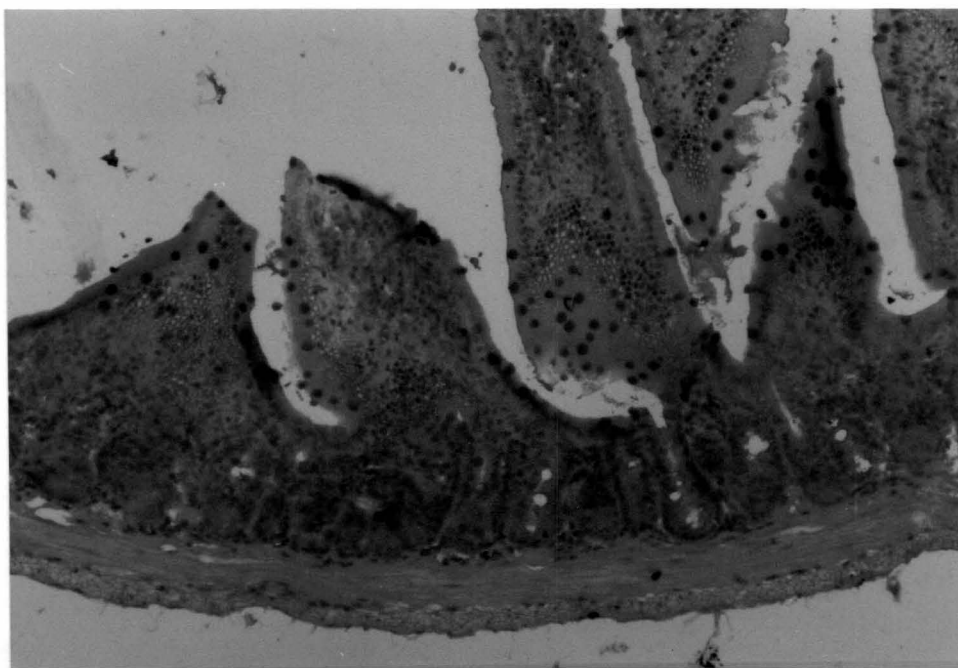


Gambar 5.7. Histogram rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin dengan dosis P0 = kontrol, P1 = 10 mg/kg, P2 = 20 mg/kg. Waktu paparan : 1 minggu ; 2 minggu ; 4 minggu ; dan 8 minggu



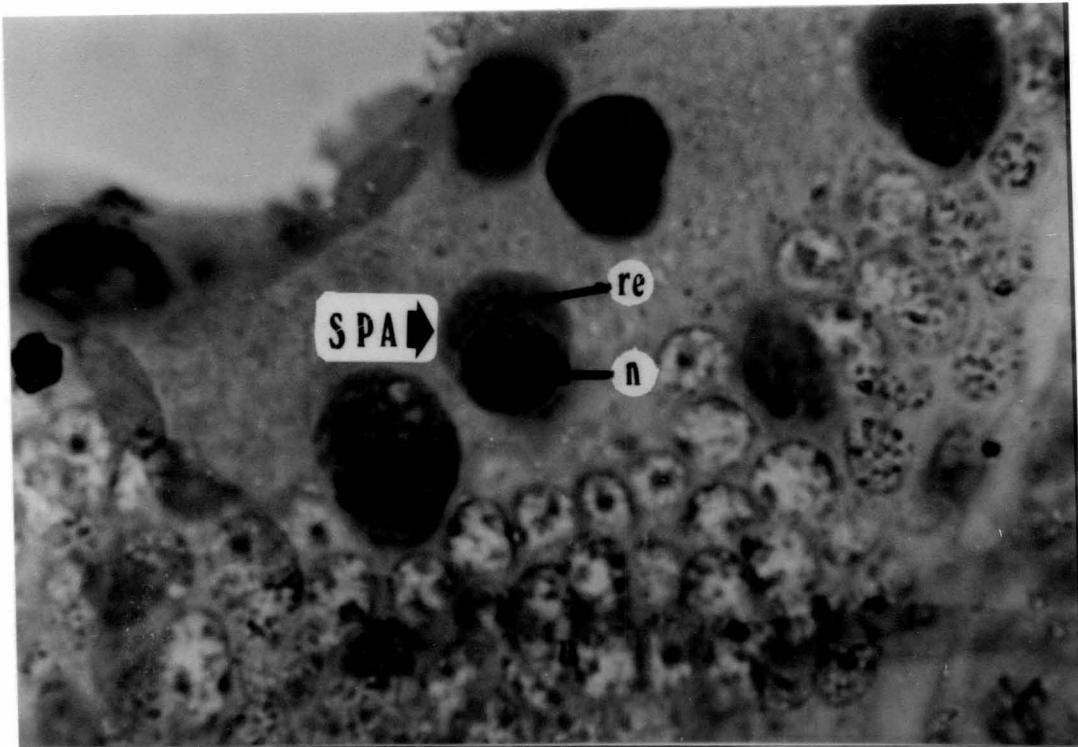
Gambar 5.7. Grafik rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit setelah pemaparan benzopirin dengan dosis P0 = kontrol, P1 = 10 mg/kg, P2 = 20 mg/kg. Waktu paparan : 1 minggu ; 2 minggu ; 4 minggu ; dan 8 minggu

Dari tabel 5.7 tersebut di atas terlihat bahwa rerata jumlah sel plasma aktif pada paparan benzopirin dengan dosis yang berbeda, menunjukkan rerata jumlah sel plasma aktif yang berbeda antara kelompok kontrol, perlakuan 10 mg/kg BB dan 20 mg/kgBB. Sedangkan dari tabel 5.8 untuk perlakuan dengan waktu paparan yang berbeda, tampak tidak adanya perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 10 mg/kg BB dan 20 mg/kg BB. Dari tabel 5.7 serta gambar 5.7 dan 5.8 tersebut di atas, terlihat bahwa rerata jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum mencit untuk kelompok kontrol menunjukkan adanya peningkatan jumlah. Untuk rerata jumlah sel plasma aktif pada kelompok perlakuan I (10 mg/kg), tampak bahwa jumlah sel plasma aktif mengalami peningkatan pada paparan 1 dan 2 minggu jika dibandingkan dengan kontrolnya, sedangkan untuk waktu paparan 4 dan 8 minggu jumlah sel plasma aktif mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan pada dosis paparan yang tinggi (20 mg/kg BB) selama 2, 4 dan 8 minggu, benzopirin dapat menekan jumlah sel plasma aktif yang terbaca, jika dibanding dengan kelompok kontrol dan perlakuan 10 mg/kg berat badan . Gambar sel plasma aktif pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit disajikan dalam gambar 5.9.



Gambar 5.6. Sel plasma aktif pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit

Perlakuan : Benzopirin
Penampang : Melintang
Tebal irisan : 5 μ
Pewarnaan : diastase Periodic Acid Schiff
Perbesaran : 100 x



Gambar 5.7. Sel plasma aktif pada struktur histopatologik mukosa ileum mencit

Perlakuan : Benzopirin

Penampang : Melintang

Tebal irisan : 5 μ

Pewarnaan : diastase Periodic Acid Schiff

Perbesaran : 1000 x

Keterangan :

SPA = Sel Plasma aktif

N = inti sel

Re = Sitoplasma dengan imunoglobulin

5.2 Analisis Data Hasil Penelitian

5.2.1 Uji homogenitas varians sampel

Sebelum dilakukan uji statistik terhadap data hasil penelitian, data terlebih dahulu dilakukan uji homogenitas. Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui dan meyakinkan apakah sampel berasal dari populasi yang homogen atau tidak (Sudjana,1995). Hasil pembacaan variabel respons imun pada sediaan mukosa ileum mencit yang diuji secara *univariate* , menunjukkan bahwa hasil uji Bartlett untuk rerata jumlah limfosit, didapatkan harga $X = 0,561$ dengan $P = 0,860$, rerata jumlah makrofag mempunyai harga nilai $X = 1,147$ dengan $P = 0,323$, sedangkan rerata jumlah sel plasma aktif diperoleh harga $X = 0,511$ dengan $P = 0,205$ (Lampiran 7). Dari daftar distribusi chi kuadrat dengan $\alpha = 0,05$ dan $dk = 11$ didapatkan harga $X_{0,95(11)} = 19,7$. Dengan demikian dapat diketahui bahwa nilai chi kuadrat untuk rerata jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif kurang dari 19,7.

Dari hasil analisis statistik uji homogenitas untuk ketiga variabel respons imun tersebut di atas, yaitu variabel limfosit, makrofag dan sel plasma aktif, karena nilai X hitung lebih kecil dari X tabel, maka dapat diinformasikan bahwa varians ke tiga variabel respons imun tersebut di atas adalah homogen. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa sampel berasal dari populasi yang homogen dan memenuhi persyaratan untuk dilakukan analisis dengan menggunakan Anava faktorial dan uji t.

5.2.2 Uji perbedaan antar kelompok sampel

Uji perbedaan tersebut di atas digunakan untuk membuktikan bahwa hasil perlakuan untuk setiap kelompok dan sub kelompok, yaitu kelompok dosis dengan klasifikasi B1 = paparan benzopirin 0 mg/kg berat badan; B2 = paparan benzopirin 10 mg/kg berat badan dan B3 = paparan benzopirin 20 mg /kg berat badan, dan kelompok waktu paparan dengan klasifikasi A1 = paparan benzopirin selama 1 minggu; A2 = paparan benzopirin selama 2 minggu; A3 = paparan benzopirin selama 4 minggu dan A4 = paparan benzopirin selama 8 minggu, keduanya memberikan hasil yang berbeda.

Untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna, dari perlakuan dosis dan waktu paparan yang diberikan, dilakukan analisis varians (Anava) dua arah yang dilanjutkan dengan uji t (Sarmanu,1993; Sarmanu,1999; Sudjana,1995). Unit analisis variabel respons imun pada penelitian ini meliputi .

a. limfosit

Dari tabel 5.1, 5.2 dan 5.3 dapat dilihat bahwa rerata jumlah limfosit pada paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan dan kombinasi dosis dan waktu paparan yang berbeda, menunjukkan rerata jumlah limfosit yang berbeda. Semakin besar dosis dan semakin lama waktu paparan benzopirin yang diberikan, semakin rendah rerata jumlah limfosit yang teramati dan terhitung.

Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna, dari perlakuan dosis dan waktu paparan benzopirin yang diberikan, dilakukan analisis varians

(Anava) dua arah (Sarmanu,1993; Sarmanu,1999). Hasil analisis varians dua arah rerata jumlah limfosit , dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, disajikan pada tabel 5.10 berikut.

Tabel 5.10.Rangkuman analisis varians dua arah terhadap rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin

Sumber Variasi	DF	SS	MS	F	P
Dosis	2	65,792	32,896	119,170	0,000
Waktu	3	23,491	7,830	28,367	0,000
Interaksi	6	102,764	17,127	62,046	0,000
Dalam	24	6,625	0,276		
Total	35	198,672	----	----	----

Dari hasil analisis varians dua arah tersebut di atas, dapat diinformasikan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah limfosit, pada dosis dan waktu paparan yang berbeda maupun interaksi keduanya, pada taraf signifikansi 5%. Hal ini terlihat dari nilai probabilitasnya kurang dari 0,05. Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan dosis dan waktu paparan yang berbeda, analisis dilanjutkan dengan uji t. Hasil analisis uji t disajikan pada lampiran 7 dan 8 .

Dari hasil analisis data dengan menggunakan uji t , terlihat bahwa rerata jumlah limfosit mukosa ileum mencit pada paparan benzopirin dengan dosis yang berbeda, menunjukkan rerata jumlah limfosit yang berbeda secara bermakna antara kelompok kontrol, perlakuan 10 mg/kg BB dan 20 mg/kgBB, dengan $P < 0,05$. Untuk perlakuan dengan waktu paparan yang berbeda, tampak bahwa antara waktu paparan 1 dan 2 minggu, 4 dan 8 minggu tidak berbeda secara bermakna dengan $P > 0,05$. Sedangkan untuk waktu paparan 1 dengan 4 dan 8 minggu, 2 dengan 4 dan 8 minggu terdapat perbedaan yang bermakna, dengan $P < 0,05$. Dari hasil uji t, untuk kombinasi antara perlakuan dosis dan waktu paparan benzopirin, sebagian besar menunjukkan rerata yang berbeda nyata, kecuali rerata antara A1B1 dengan A2B1, dan A2B3, antara A1B2 dengan A1B3, dan A3B2, antara A2B2 dengan A3B1 dan antara A3B3 dengan A4B2 dan A4B3. Dari hasil analisis data tersebut di atas dapat dikatakan bahwa semakin besar dosis dan waktu paparan benzopirin yang diberikan semakin menurun jumlah limfosit yang terbaca. Dengan demikian dapat diinformasikan bahwa benzopirin merupakan imunogen pada dosis dan waktu paparan yang rendah (A2B2), sedangkan untuk dosis dan waktu paparan yang meningkat (A3B3 dan A4B3), benzopirin akan bersifat immunosupresif terhadap rerata jumlah limfosit yang terbaca.

b. makrofag

Dari tabel 5.4,5.5 dan 5.6, dapat diketahui bahwa rerata jumlah makrofag pada kelompok kontrol (A1B1,A2B1,A3B1 dan A4B1)

menunjukkan adanya peningkatan jumlah jika dibandingkan dengan rerata jumlah limfosit pada kelompok perlakuan I (A1B2,A2B2,A3B2 dan A4B3) dan pada kelompok perlakuan II (A1B3,A2B3,A3B3 dan A4B3). Semakin besar dosis dan semakin lama waktu paparan benzopirin yang diberikan , semakin rendah rerata jumlah makrofag yang teramati dan terhitung.

Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna, dari perlakuan dosis dan waktu paparan yang diberikan, dilakukan analisis varians (Anava) dua arah. Hasil analisis varians dua arah rerata jumlah makrofag, dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan , disajikan pada tabel 5.11 berikut.

Tabel 5.11. Rangkuman analisis varians dua arah terhadap rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin

Sumber Variasi	DF	SS	MS	F	P
Dosis	2	1,399	0,700	2,457	0,105
Waktu	3	4,894	1,631	5,730	0,004
Interaksi Dalam	6	24,767	4,128	14,498	0,000
Total	24	6,833	0,285		
	35	37,894	-----	-----	-----

Dari hasil analisis varians dua arah tersebut di atas, dapat diinformasikan bahwa variabel dosis paparan benzopirin yang berbeda tidak memberikan perbedaan yang bermakna terhadap jumlah makrofag, hal ini terlihat dari nilai

harga $P > 0,05$, namun untuk perlakuan waktu paparan yang berbeda maupun interaksi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda memberikan perbedaan yang bermakna pada taraf signifikansi 5%. Hal ini terlihat dari nilai $P < 0,05$.

Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan dosis dan waktu paparan yang berbeda, analisis dilanjutkan dengan uji t. Hasil uji t rerata jumlah makrofag pada masing-masing kelompok perlakuan dosis dan waktu paparan yang berbeda, disajikan pada lampiran 9 dan 10. Dari hasil analisis data dengan menggunakan uji t, tersebut terlihat bahwa rerata jumlah makrofag mukosa ileum mencit pada paparan benzopirin dengan dosis yang berbeda, menunjukkan rerata jumlah makrofag yang tidak berbeda secara bermakna antara kelompok kontrol, perlakuan 10 mg/kg BB maupun perlakuan 20 mg/kgBB, dengan $P > 0,05$. Sedangkan untuk perlakuan dengan waktu paparan yang berbeda, tampak adanya perbedaan yang bermakna, dengan $P < 0,05$, kecuali antara waktu paparan 1 dengan 4 dan 8 minggu, 4 dan 8 minggu tidak berbeda secara bermakna dengan $P > 0,05$. Sedangkan untuk waktu paparan 1 dengan 2 minggu, 2 dengan 4 dan 8 minggu terdapat perbedaan yang bermakna, di mana $P < 0,05$. Dari hasil uji t untuk kombinasi antara perlakuan dosis dan waktu paparan benzopirin, sebagian besar dosis dan waktu paparan yang diberikan menunjukkan rerata jumlah makrofag yang berbeda nyata, kecuali rerata antara A1B1 dengan A1B2, A3B2, A3B3, A4B2 dan A4B3, antara A1B2 dengan A2B1, A3B1, A3B2, A3B3, dan A4B2, antara A1B3 dengan A2B2, A2B3, A3B1 dan A4B1, antara A2B1 dengan A2B3, A3B1, A3B2 dan A4B2, antara A2B2 dengan A4B1, antara A2B3 dengan A3B2, antara A3B1 dengan A3B2, antara A3B2

dengan A3B3 dan A4B2, antara A3B3 dengan A4B2 dan A4B3. Dari hasil analisis data tersebut di atas dapat dikatakan bahwa semakin besar dosis dan waktu paparan benzopirin yang diberikan semakin menurun jumlah makrofag yang terbaca. Dengan demikian dapat diinformasikan bahwa benzopirin merupakan imunogen pada dosis dan waktu paparan yang rendah (A2B2), sedangkan untuk dosis dan waktu paparan yang meningkat (A3B3 dan A4B3), benzopirin akan bersifat immunosupresif terhadap rerata jumlah makrofag yang terbaca.

c. sel plasma aktif

Dari tabel 5.7,5.8 dan 5.9 dapat diketahui bahwa rerata jumlah sel plasma aktif pada kelompok kontrol, menunjukkan adanya peningkatan jumlah jika dibandingkan dengan rerata jumlah sel plasma aktif pada kelompok perlakuan 10 mg/kg BB dan 20 mg/kg BB. Semakin besar dosis dan semakin lama waktu paparan benzopirin yang diberikan , semakin rendah rerata jumlah sel plasma aktif yang teramati dan terhitung pada mukosa ileum mencit.

Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna, dari perlakuan dosis dan waktu paparan yang diberikan, dilakukan analisis varians (Anava) dua arah, yang dilanjutkan dengan uji t. Hasil analisis varians dua arah rerata jumlah sel plasma aktif , dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan , disajikan pada tabel berikut.

Tabel 5.12. Rangkuman analisis varians dua arah terhadap rerata jumlah sel plasma aktif mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin

Sumber Variasi	DF	SS	MS	F	P
Dosis	2	8,983	4,491	17,599	0,000
Waktu	3	0,819	0,273	1,070	0,381
Interaksi	6	18,503	3,084	12,084	0,000
Dalam	24	6,125	0,255		
Total	35	---	---	---	---

Dari hasil analisis varians dua arah tersebut di atas, dapat diinformasikan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna untuk variabel waktu paparan terhadap penurunan jumlah sel plasma aktif, di mana nilai F hitung = 1,070 dengan harga P = 0,381 . Sedangkan untuk perlakuan dosis dan interaksi antara dosis dengan waktu paparan benzopirin, terdapat perbedaan yang bermakna terhadap jumlah sel plasma aktif, untuk taraf signifikansi 5% . Hal ini terlihat dari nilai probabilitasnya kurang dari 0,05. Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan dosis dan waktu paparan yang berbeda, analisis dilanjutkan dengan uji t. Hasil uji t rerata jumlah limfosit pada masing-masing kelompok perlakuan dosis dan waktu paparan yang berbeda, disajikan pada lampiran 11 dan lampiran 12 .

Dari hasil uji t yang dilakukan dapat diinformasikan bahwa untuk kelompok perlakuan dosis, semua rerata jumlah sel plasma aktif berbeda secara bermakna dengan $P < 0,05$, tetapi untuk kelompok waktu paparan rerata jumlah sel plasma aktif tidak berbeda secara bermakna, dengan $P > 0,05$. Sedangkan untuk kombinasi antara dosis dan waktu paparan, sebagian besar menunjukkan perbedaan yang bermakna, kecuali rerata antara A1B1 dengan A1B3, A2B1, A2B3, A3B2, A3B3, A4B2 dan A4B3, antara A1B2 dengan A1B3, A2B1, A2B2, A3B1, dan A3B2, antara A1B3 dengan A2B1, A2B2, A2B3, A3B1, dan A3B3, antara A2B1 dengan A2B2, A2B3, A3B1, dan A3B2, antara A2B2 dengan A3B1 dan A3B2, antara A2B3 dengan A3B2, A3B3 dan A4B2, antara A3B1 dengan A3B2, antara A3B3 dengan A4B2 dan A4B3. Dari hasil analisis data tersebut di atas dapat dikatakan bahwa semakin besar dosis dan waktu paparan benzopirin yang diberikan semakin menurun jumlah sel plasma aktif yang terbaca. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa benzopirin merupakan imunogen pada dosis dan waktu paparan yang rendah (A2B2), sedangkan untuk dosis dan waktu paparan yang meningkat (A3B3 dan A4B3), benzopirin akan bersifat immunosupresif terhadap rerata jumlah makrofag yang terbaca.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan ini bertujuan untuk menjelaskan terjadinya penurunan respons imun, yang terjadi pada mukosa ileum mencit yang terpapar senyawa benzopirin. Untuk mencapai tujuan tersebut dibuat rancangan penelitian eksperimental dengan rancangan faktorial, dengan faktor dosis dan waktu paparan benzopirin yang berbeda, yang dilakukan pada mencit jantan.

Penelitian ini dirancang dalam 3 kelompok dosis yang berbeda, yaitu kelompok kontrol (0 mg/kg berat badan), perlakuan I (10 mg/kg berat badan) dan kelompok II (20 mg/kg berat badan). Setiap kelompok dosis dibagi lagi menjadi 4 kelompok waktu paparan yang berbeda, yaitu paparan 1, 2, 4 dan 8 minggu. Maksud pembagian tersebut supaya dapat membandingkan respons imun yang dicerminkan dari pola respons imunopatobiologik dari setiap kelompok dosis dan waktu paparan yang berbeda, jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Penelitian eksperimental ini adalah jenis penelitian yang dapat menghasilkan data dan hasil penelitian dengan kualitas dan validitas yang tinggi, dengan tingkat akurasi yang sukar dicapai bila menggunakan rancangan penelitian yang lain. Paparan benzopirin yang diberikan merupakan rekayasa peneliti, dalam hal ini yang dimaksud adalah perbedaan dosis dan waktu

paparan benzopirin, berdasarkan landasan empirik dan dan uji pendahuluan yang telah dilakukan oleh peneliti.

Untuk memenuhi persyaratan supaya memperoleh hasil penelitian yang akurat dengan validitas yang tinggi, maka pada data hasil penelitian dilakukan uji homogenitas, untuk melihat apakah sampel penelitian berasal dari populasi yang homogen, untuk itu dilakukan uji homogenitas dengan *Anova univariate*. Dari hasil uji homogenitas dengan menggunakan uji *Anova univariate* ternyata data dari masing-masing variabel respons imun yang digunakan dalam penelitian ini bersifat homogen dan memenuhi persyaratan untuk dilakukan analisis data dengan menggunakan Anava faktorial dan uji t.

Data yang dipakai untuk analisis statistik pada penelitian ini adalah data yang berasal dari variabel komponen respons imun, yang terdiri atas 3 variabel respons imun antara lain : jumlah limfosit, makrofag, dan sel plasma aktif. Untuk mengekspresikan variabel tersebut digunakan metode pengecatan sediaan histopartologik dengan menggunakan metode HE (hematoksilin eosin) untuk variabel limfosit dan makrofag serta metode pengecatan d PAS (diastase periodic acid schiff) untuk variabel sel plasma aktif.

Pada penelitian ini digunakan paradigma patobiologik yang berkonsep imunopatobiologik mukosal, dengan pemeriksaan variabel secara morfofungsi yang digunakan sebagai arahan atau pegangan, untuk dapat mengungkap imunopatogenesis respons imun mukosal ileum mencit, di mana komponen respons imun yang dimaksud adalah, sel imunokompeten mukosa ileum mencit yang sedang mengalami stress akibat paparan benzopirin. Paradigma

patobiologik didefinisikan sebagai cara atau model berfikir, untuk menalar segala perubahan biologik yang tidak lazim, yang terjadi sebagai akibat dari tubuh yang berinteraksi dengan lingkungan yang merusak (Constantinides, 1994).

Seiring dengan penggunaan paradigma patobiologik untuk mengungkap dan memecahkan masalah penelitian, maka pemanfaatan kerangka konseptual penelitian adalah sangat penting, dan diperlukan untuk memperoleh variabel penelitian yang dimaksud. Untuk dapat mengungkap variabel penelitian menjadi data penelitian, maka konsep morfofungsi dipilih untuk mengempirikkan data penelitian ke dalam bentuk komponen respons imun (sel imunokompeten) yang sedang melakukan aktifitas fungsi biologiknya, berinteraksi satu dengan yang lain dalam melaksanakan fungsi respons imun (Putra, 1984).

Untuk mengetahui pengaruh paparan benzopirin terhadap penurunan respons imun mukosa ileum mencit pada dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda, digunakan analisis statistik yang dapat mengukur adanya fungsi interaksi di antara faktor dosis dan waktu paparan yang berbeda, yaitu Anava faktorial. Sedangkan untuk mengetahui adanya perbedaan rerata variabel respons imun, antar dosis, antar waktu paparan serta inter dosis dan waktu paparan, apabila uji Anava faktorial bermakna analisis statistik dilanjutkan dengan uji t.

Untuk menjelaskan hipotesis dan membuktikan tujuan penelitian, diperlukan penjelasan yang didasarkan pada hasil penelitian yang meliputi

jumlah limfosit, makrofag serta sel plasma aktif. Hasil penghitungan terhadap variabel jumlah limfosit, menunjukkan bahwa secara keseluruhan faktor dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan benzopirin terhadap jumlah limfosit berbeda secara bermakna dengan $P < 0,05$ (tabel 5.1, 5.2, 5.10 serta lampiran 7 dan 8). Di mana semakin besar dosis dan semakin lama waktu paparan benzopirin yang diberikan, semakin menurun jumlah limfosit yang terbaca dan terhitung. Namun apabila dilihat dari gambar 5.1 dan 5.2, di mana rerata jumlah limfosit pada paparan dengan dosis 10 mg/kg berat badan selama 2 minggu menunjukkan rerata jumlah limfosit yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrolnya, Dari temuan ini dapat diinformasikan bahwa paparan benzopirin dengan dosis yang lebih rendah dan waktu paparan yang lebih cepat, benzopirin bersifat sebagai imunogen karena dapat merangsang atau membangkitkan respons imun dalam hal ini jumlah limfosit. Sedangkan untuk dosis dan waktu paparan benzopirin yang meningkat (20 mg/kg berat badan selama 4 dan 8 minggu), benzopirin mampu menekan jumlah limfosit yang terbaca dan terhitung pada mukosa ileum mencit. Dari temuan ini dapat diinformasikan bahwa pada dosis yang lebih besar dan waktu paparan yang lebih lama, benzopirin bersifat immunosupresif yang menyebabkan terjadinya gangguan fungsi sel imunokompeten sehingga terjadi penekanan *limphopoesis* sel. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Davila (1996) dan Marhendra (1995), yang menyatakan bahwa senyawa benzopirin pada dosis yang tinggi dapat menghambat *limphopoesis* dan bersifat imunotoksik terhadap komponen T sel.

dapat menghambat *limphopoesis* dan bersifat imunotoksik terhadap komponen T sel.

Dari hasil pembacaan dan penghitungan terhadap variabel jumlah makrofag, serta dari hasil analisis statistik yang digunakan, dapat diinformasikan bahwa untuk faktor dosis paparan benzopirin yang berbeda (0, 10 dan 20 mg/kg berat badan) tidak ada perbedaan yang bermakna, dengan $P > 0,05$ (tabel 5.4), namun untuk faktor waktu paparan yang berbeda (1, 2, 4 dan 8 minggu) serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda, menunjukkan adanya perbedaan secara bermakna, dengan $P < 0,05$ (tabel 5.5, 5.11 serta lampiran 9 dan 10). Di mana semakin besar dosis dan semakin lama waktu paparan yang diberikan, semakin sedikit jumlah makrofag yang terbaca dan terhitung. Jika dilihat dari gambar 5.4 dan 5.5 terlihat bahwa rerata jumlah makrofag pada paparan 10 mg/kg berat badan selama 2 minggu, menunjukkan jumlah makrofag paling besar jika dibandingkan dengan kelompok kontrol secara keseluruhan, hal ini menunjukkan bahwa pada paparan dengan dosis dan waktu paparan yang rendah (10 mg/kg BB) selama 2 minggu, benzopirin bersifat imunogenik yang mampu merangsang pembentukan sel imunokompeten dan mampu membangkitkan respons imun mukosa ileum mencit, dalam hal ini jumlah makrofag yang terbaca dan terhitung. Sedangkan pada dosis yang lebih besar dan waktu paparan yang lebih lama (20 mg/kg berat badan) selama 4 dan 8 minggu, paparan benzopirin justru mampu menekan jumlah makrofag yang terbaca dan terhitung pada tiap lapang pandang yang teramati. Dari temuan ini dapat

ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Dean (Marhendra,1995) bahwa pada dosis dan frekuensi paparan yang meningkat, benzopirin dapat menghambat produk interleukin-1 (IL-1) oleh makrofag, yang menyebabkan kelainan induksi kimia serta menyebabkan gangguan pada fungsi sel imunokompeten yang lain.

Dari hasil pembacaan, penghitungan dan analisis statistik yang digunakan terhadap variabel jumlah sel plasma aktif, dapat dikatakan bahwa paparan benzopirin dengan dosis paparan yang berbeda, menunjukkan hasil yang berbeda secara bermakna, dengan $P < 0,05$ (tabel 5.7), dari tabel 5.8 untuk waktu paparan yang berbeda, tidak menunjukkan adanya perbedaan secara bermakna , dengan $P > 0,05$. Sedangkan untuk interaksi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda, memperlihatkan adanya perbedaan secara bermakna, dengan $P < 0,05$. Di mana semakin besar dosis dan semakin lama waktu paparan benzopirin yang diberikan, semakin sedikit jumlah sel plasma aktif yang terbaca dan terhitung per lapang pandang. Dari gambar 5.7 dan 5.8 dapat dilihat bahwa pada dosis yang berbeda untuk waktu paparan 1 dan 2 minggu, jumlah sel plasma aktif yang terbaca melebihi jumlah kontrolnya, disini dapat dikatakan bahwa paparan benzopirin dengan dosis 10 mg / kg berat badan selama 1 dan 2 minggu, benzopirin bersifat imunogenik yang mampu merangsang pembentukan sel plasma aktif dan mampu membangkitkan komponen respons imun pada mukosa ileum mencit, tetapi pada dosis yang lebih tinggi (20 mg/kg berta badan) dengan waktu paparan 4 dan 8 minggu benzopirin justru dapat menekan jumlah sel plasma aktif yang terbaca dan

terhitung. Dari temuan ini dapat dikatakan bahwa benzopirin bersifat imunosupresif yang mampu menekan sel plasma aktif pada mukosa ileum mencit. Dengan demikian temuan ini sesuai dengan pernyataan dari Goodman (1994), Kumar (1997) serta Martoprawiro (1992), yang menyatakan bahwa senyawa benzopirin dapat menghambat sel pembentuk antibodi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.1, 5.2 ; 5.4, 5.5; serta 5.7, dan 5.8, terlihat adanya peningkatan rerata jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif, seiring dengan pertambahan usia mencit, di mana jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif, yang terbaca dan terhitung pada mencit usia 4 bulan berbeda dengan rerata jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif pada mencit usia 2 dan 3 bulan. Temuan ini menunjukkan adanya pertumbuhan dan perkembangan yang normal pada kelompok kontrol, hal ini sesuai dengan laporan hasil penelitian yang dilakukan oleh Marhendra (1995) dan Jain (1986), yang melaporkan bahwa peningkatan jumlah leukosit pada tikus dan mencit akan mencapai puncaknya pada usia 5 sampai 6 bulan dan selanjutnya setelah usia di atas 6 bulan akan mengalami penurunan seiring dengan pertambahan usia pada tikus atau mencit. Sedangkan untuk paparan benzopirin dengan dosis dan waktu paparan yang rendah (10 mg/kg berat badan) selama 1 dan 2 minggu, benzopirin bersifat imunogenik yang mampu membangkitkan respons imun mukosa ileum mencit, dalam hal ini jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif. Paparan dengan dosis dan waktu paparan yang lebih tinggi (20 mg/kg berat badan) selama 4 dan 8 minggu, dapat diketahui bahwa

benzopirin bersifat immunosupresif, karena mampu menekan jumlah sel imunokompeten, dalam hal ini jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif yang terbaca dan terhitung per lapang pandang.

Dari hasil penelitian ini dapat diinformasikan bahwa semakin besar dosis dan semakin lama waktu paparan benzopirin yang diberikan, semakin menurun jumlah limfosit, makrofag dan sel plasma aktif yang terbaca dan terhitung pada mukosa ileum mencit per lapang pandang.

Penurunan respon imun yang terjadi pada mukosa ileum mencit, selain ditandai dengan penurunan jumlah sel imunokompeten, juga ditandai dengan adanya penurunan jumlah folikel-folikel limfoid pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrolnya. Hal ini dapat diketahui pada paparan 4 dan 8 minggu, terjadi penurunan ukuran ketebalan vili pada sebagian mukosa ileum yang diikuti dengan penurunan jumlah folikel limfoid pada mukosa ileum mencit, di samping terjadi lesi degeneratif dan perubahan ultra struktur pada mukosa ileum mencit. Namun pada beberapa bagian dari mukosa ileum mencit dari kelompok perlakuan, utamanya kelompok perlakuan 20 mg/kg berat badan, justru lebih banyak terjadi peningkatan ketebalan mukosa, hal ini dimungkinkan karena benzopirin yang bersifat karsinogenik mampu merangsang proliferasi dan hiperplasia sel epitel mukosa ileum mencit yang mengarah ke terjadinya kanker usus.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh melalui serangkaian penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Paparan benzopirin dengan dosis, waktu paparan serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda menurunkan jumlah limfosit pada mukosa ileum menciit;
2. Paparan benzopirin dengan: (a) dosis yang berbeda tidak menurunkan jumlah makrofag pada mukosa ileum menciit, (b) waktu paparan yang berbeda serta kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda menurunkan jumlah makrofag pada mukosa ileum menciit;
3. Paparan benzopirin dengan : (a) dosis yang berbeda menurunkan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum menciit, (b) waktu paparan yang berbeda tidak menurunkan jumlah sel plasma aktif pada mukosa ileum menciit, (c) kombinasi antara dosis dan waktu paparan yang berbeda menurunkan jumlah sel plasma aktif mukosa ileum menciit.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka perlu dilakukan penyuluhan kepada masyarakat mengenai perlunya perlindungan diri, terhadap senyawa yang berpotensi menurunkan respons imun yang dapat menyebabkan terjadinya kanker usus seperti benzopirin. Untuk itu perlu dipertimbangkan, dalam mengungkap imunopatogenesis di mukosa ileum mencit yang terpapar benzopirin yang dapat menyebabkan peningkatan progresivitas kanker usus , pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemeriksaan variabel respons imun seluler seperti makrofag, CD4,CD8 serta sitokin dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia .

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 1994. **Cellular and Molecular Immunology**, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Bancroft JD, 1984. **Manual of Histological Techniques**. First Published. Churchill Livingstone. New York.
- Bancroft JD, 1982. **Theory and Practice of Histological Techniques**, 2nd edition, Churchill Livingstone. New York.
- Baratawidjaya KG, 1996. **Imunologi Dasar**. Edisi Ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bellanti JA, Robbin JB, 1993. **Immunology**. Dalam Imunologi III. Terjemahan Samik Wahab A., Cetakan Pertama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Cassarett & Doull's, 1986. **Toxicology The Basic Science of Poison**. Third edition. Mc. Millan Pub. Co. New York.
- Constantinides P, 1994. **General Pathobiology**. Appleton & Lange. Norwalk Conneticut.
- Davila DR, 1996. Human T Cells Are Highly Sensitive To Suppression of Mitogenesis By Polycyclic Aromatic Hidrocarbons and This Effect is Differentially Reversed by Alpha-Naphthoflavone. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** Aug. 139 (2): 333-341.

- deBithizy J, Hayes JR, 1989. **Principles and Methods of Toxicology**. 2nd edition. Raven Press Ltd. New York.
- Fernandes AO, Banerji AP, 1995. Inhibition of Benzo(a)pyrene Induced Forestomach Tumor by Field Bean Protease Inhibitors. **J. Carcinogenesis**. Agust. : 16 (8) : 1843-1846.
- Goodman JW, 1994. The Immune Response. In **Basic & Clinical Immunology**, edited by Daniel P Stites, Abba I Terr, Tristram G. Parslow. 8th edition. A Lange Medical Book. 40-49.
- Hardin JA, 1992. Mechanism by Which Benzo(a)pyrene, and Environmental Carcinogen, Suppress B Cell Lymphopoiesis. **Toxicol Appl. Pharmacol.** 117 (2) : 155 – 164.
- Husen SA, 1998. Pengaruh Penurunan respons Imun Seluler terhadap Peningkatan Progresivitas Kanker Payudara Pada Mencit (*Mus musculus L*) Akibat Induksi **Benzopirena**. **Lembaga Penelitian Universitas Airlangga**. Surabaya.
- Higgins JE, Klinbaum AP, Miller P, 1985. Introduction to Randomized Clinical Trials, The basis of Randomized Clinical Trial With an Emphasis on Contraceptive Research, **Family health International Research Triangle Park**, North Carolina.
- Hengartner H, 1996. Decreased Tumor Surveillance in Perforin – Deficient Mice. **J. Exp. Med.** 184 (1) : 1781-1790.

- Khatib J, 1998. Pengaruh Pemberian B Karoten Dan kombinasi Vitamin E – Vitamin C Terhadap Kanker Pada Mencit Galur Balb/C Yang Diinduksi Dengan Benzo(a)pirena . **Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.**
- Kumar V, Cotran RS, Robbin SL, 1997. **Pathologic Basic of Disease.** 5th edition, London. WB Saundres Company.
- Lu FC, 1995. **Toksikologi Dasar : Azas, Organ sasaran dan Penilaian resiko,** Edisi ke 2. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Marhendra APW, 1995. Profil Protein Serum, Struktur Bronkiolus dan komposisi Leukosit setelah Pemberian Benzo(a)pirin pada Tikus (*Rattus norvegicus*, L). **Tesis Program Pasca Sarjana UGM.** Yogyakarta.
- Martoprawiro SS, 1992. **Kanker Kegagalan Pengendalian Sel.** Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Mustaina S, 1998. Pengaruh Timbal Asetat terhadap Perubahan Sistim Ketahanan Imunologik Pada Mukosa usus mencit . **Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.**
- Parslow TG, 1994. The Phagocytocytes : Neutrophils & Macropahges. In **Basic & Clinical Immunology.** Edited by Daniel P Stites, Abba I Terr, Tristram G Parslow, 8th edition. A Lange Medical Book. 9-21.
- Pastore CD, Annibel A, 1993. Malignant Tumors of The Small Intestine. **Minerva-Chin.** Dec. (48) : 23-24.

- Playfair JHL, 1991. **Immunology at a Glance**. 5 ed Oxford. Scientific Publication.
- Pudjirahardjo WJ, Poernomo H, Machfoed MH, 1996. **Metode Penelitian Dan Statistik Terapan**. Penerbit Airlangga University Press. Surabaya.
- Pudjiastuti P, 1998. Uji Aktivitas Antitumor Triterpen Dari Kulit Batang Kecapi Kera (*Sondaricum emarginatum* Hiern) Pada Sistem Kultur Sel Tumor Hasil Induksi Benzo(a)pirena Pada Mencit. Lembaga penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Putra ST, 1984. Perubahan Gambaran Sitologik Kelenjar Getah Bening Dan Kadar Gama Globulin Serum Marmot Akibat Injeksi Vaksin Marek. **Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga**. Surabaya.
- Putra ST, 1997. Konsep Patobiologi dan Imun Mukosal. **Dalam Imunologi Mukosal Kedokteran**. Editor oleh Pitono Soeparto, Suhartono Taat Putra, FM Judajana, Subianto Marto S. GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Putra ST, 1997a. **Biologi Molekuler Kedokteran**. Airlangga University Press. Surabaya.
- Putra ST, 1997b. **Patofisiologi Kedokteran**. Bagian Patologi anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Roitt I, 1987. **Essential Immunology**. 1 st edition, Oxford. Blackwell Scientific Publication.
- Sarmanu, 1993. Statistik Parametrik : Uji t dan Uji Anova. Penataran Metodologi Penelitian, Statistik dan Komputer. **Lembaga Penelitian Universitas Airlangga**. Surabaya.

- Sarmanau, Rustija, Dyah Hariani, 1999. Manipulasi Jenis Kelamin Jantan Ikan Nila Merah. Laporan Penelitian Program Penelitian Dasar. **Lembaga Penelitian Universitas Airlangga** . Surabaya.
- Sigal LH, Ron Y, 1994. Polymorphonuclear Phagocytic Cells. In **Imunology and Inflammation** . New York. Mc Graw-Hill : 303-317.
- Subowo, 1993. **Imunobiologi**. Cetakan Pertama. Penerbit Angkasa. Bandung
- Soeparto P, 1997. Immunologi Intestinal. Dalam **Imunologi Mukosal Kedokteran**. Editor oleh Pitono Soeparto, Suhartono T. Putra, FM Judajana, Subianto MS. GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya
- Soeparto P, 1997. Saluran Cerna Pada Keadaan Defisiensi Imun. Dalam **Imunologi Mukosal Kedokteran**. Editor oleh Pitono Soeparto. Suhartono Taat Putra, FM Judajana, Subianto Marto S. GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Strober W, James SP, 1994. The Mucosal Immune System. In **Basic & Clinical Immunology**, edited by Daniel P. Stites, Abba I Terr, Tristram G. Parslow. 8th edition. a Lange Medical Book. 541-551.
- Sudiana, IK, 1991. **Technik Praktis Untuk Jaringan Sel**. Penerbit CV Dharma Shandi. Jembrana. Negara.
- Sudjana. 1989. **Metode Penelitian**. Edisi ke 5. Penerbit Tarsito. Bandung
- Sugianto. 1992. Karsinogenesis Kimiawi. Materi Kursus Singkat Onkologi. PAU **Bioteknologi UGM**. Yogyakarta.
- Tjokroprawiro A, 1997. **Pedoman Penelitian Kedokteran**. Editor oleh Askandar Tjokroprawiro, Widodo Jatim Pudjirahardjo, Suhartono Taat Putra. Airlangga University Press. Surabaya.
- Wasito, 1992. Inisiasi Promosi Tumorigenik II. Materi Kursus Singkat Onkologi. PAU **Bioteknologi UGM**. Yogyakarta.
- Weiss GR, 1993. **The Cancer Problem in Clinical Oncology**. Prentice Hall Int. Inc.

Lampiran 1.

Hasil uji pendahuluan untuk menentukan besar sampel variabel limfosit

Rerata hasil penghitungan jumlah limfosit per lapang pandang Pada mukosa ileum menci

No. Individu	Rerata Jumlah Limfosit	
	Kontrol	Perlakuan
1	8,75	6,75
2	8,50	7,25
3	9,50	7,50
4	9,00	7,50
X	8,94	7,25
SD	0,43	0,35

Dengan menggunakan rumus :

$$n_i = \frac{1}{1-f} + \frac{2(Z_a + Z_b)^2 \cdot S^2}{|X_c - X_t|}$$

Dimana $Z_a = 1,96$
 $Z_b = 1,28$
 $f = 5\% (0,05)$

Maka didapatkan $n_i = 2,42$

Sehingga besar sampel minimal tiap kelompok perlakuan untuk variabel

Limfosit = 3 individu.

Lampiran 2.

**Hasil uji pendahuluan untuk menentukan besar sampel variabel
Sel plasma aktif mukosa ileum mencit.**

Rerata jumlah sel plasma aktif per lapang pandang mukosa ileum mencit

No. Individu	Rerata Jumlah Sel Plasma	
	Kontrol	Perlakuan
1	5,75	4,25
2	6,25	5,25
3	5,25	3,00
4	6,00	3,50
X	5,81	4,00
SD	0,43	0,98

Dengan menggunakan rumus :

$$n_i = \frac{1}{1-f} + \frac{2(Z_a + Z_b)^2 \cdot S^2}{|X_c - X_t|}$$

Dimana $Z_a = 1,96$
 $Z_b = 1,28$
 $f = 5\% (0,05)$

Maka didapatkan $n_i = 2,25$

Sehingga besar sampel minimal tiap kelompok untuk variabel sel plasma aktif = 3 individu.

Lampiran 3.

Data Hasil Penghitungan Jumlah Limfosit Mukosa Ileum Mencit Per Lapang Pandang

Kelompok Perlakuan	Jumlah Limfosit				
	LP ₁	LP ₂	LP ₃	LP ₄	x
P _{0.1}	7	10	11	8	9,00
	9	11	8	7	8,75
	8	7	9	8	8,00
P _{0.2}	9	8	7	10	8,50
	10	7	10	8	8,75
	7	12	11	12	10,50
P _{0.3}	10	11	12	11	11,00
	11	10	14	8	10,75
	12	10	13	12	11,75
P _{0.4}	12	11	13	12	12,00
	14	11	12	12	12,25
	14	12	12	13	12,75



P _{1.1.}	10	11	9	8	9,50
	12	8	8	11	9,75
	12	9	8	12	10,25
P _{1.2.}	10	12	10	12	11,00
	12	10	11	10	10,75
	10	11	12	12	11,25
P _{1.3.}	8	7	6	6	6,75
	6	7	8	8	7,25
	6	8	9	7	7,50
P _{1.4.}	6	6	5	5	5,50
	5	4	6	6	5,25
	6	5	7	6	6,00

P _{2.1.}	11	10	9	10	10,00
	10	9	9	10	9,50
	8	10	12	11	10,25
P _{2.2.}	6	8	7	8	7,25
	8	10	8	7	8,25
	9	8	6	8	7,75
P _{2.3.}	6	5	6	5	5,50
	5	6	6	7	6,00
	6	4	7	4	5,25
P _{2.4.}	4	5	7	4	5,00
	6	4	4	5	4,75
	4	5	6	6	5,25

Keterangan :

P = Perbesaran 400 x

LP = Lapang Pandang

Lampiran 4.

**Data Hasil Penghitungan Jumlah Makrofag Mukosa Ileum Mencit
Perlapang Pandang**

Kelompok Perlakuan	Jumlah Makrofag				
	LP ₁	LP ₂	LP ₃	LP ₄	x
P _{0.1}	4	0	5	3	3,00
	4	4	0	5	3,25
	5	0	6	3	3,50
P _{0.2}	5	3	6	5	4,75
	4	5	3	6	4,50
	6	4	0	4	3,50
P _{0.3}	6	0	3	5	3,50
	2	6	4	6	4,50
	5	4	6	6	5,25
P _{0.4}	6	5	7	6	6,00
	7	6	5	4	5,50
	6	4	6	7	5,75

P _{1.1.}	5	4	0	4	3,25
	3	6	2	5	4,00
	6	3	2	4	3,75
P _{1.2.}	4	6	7	3	5,00
	7	5	4	6	5,50
	6	7	6	5	6,00
P _{1.3.}	6	5	0	4	3,75
	3	6	4	2	3,75
	4	3	5	4	4,00
P _{1.4.}	5	0	4	6	3,75
	3	5	2	4	3,50
	4	0	5	4	3,25

P _{2.1.}	5	6	8	6	6,25
	6	5	4	3	4,50
	4	6	3	7	5,00
P _{2.2.}	3	7	6	4	5,50
	4	5	5	3	4,25
	3	5	4	4	4,00
P _{2.3.}	3	0	5	4	3,00
	6	4	0	3	3,00
	5	4	2	3	3,50
P _{2.4.}	4	0	3	4	2,75
	5	4	0	3	3,00
	5	0	3	3	2,50

Keterangan :

P = Perbesaran 400 x

LP = Lapang Pandang

Lampiran 5.

Data Hasil Perhitungan Jumlah Sel Plasma Aktif Mukosa Hewan Mencit Per Lapang Pandang

Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel Plasma Aktif				
	LP ₁	LP ₂	LP ₃	LP ₄	
P _{0.1}	3	4	5	3	3,75
	3	5	2	4	3,50
	4	6	3	0	3,25
P _{0.2}	6	4	0	7	4,25
	5	4	5	3	4,25
	6	5	3	4	4,50
P _{0.3}	3	5	4	5	4,25
	4	5	6	6	5,25
	2	6	8	5	5,25
P _{0.4}	6	5	7	5	5,75
	7	8	5	4	6,00
	8	6	5	6	6,25

P _{1.1.}	6	5	5	4	5,00
	4	3	6	5	4,50
	6	5	4	4	4,75
P _{1.2.}	4	6	4	3	4,25
	6	5	3	7	5,25
	6	5	3	6	5,00
P _{1.3.}	8	6	0	5	4,75
	6	8	3	4	5,25
	5	4	3	0	3,00
P _{1.4.}	4	3	2	3	3,00
	3	0	4	6	3,25
	6	4	0	2	3,00

P _{2.1.}	5	4	5	6	3,50
	4	6	4	3	4,25
	5	6	2	5	4,50
P _{2.2.}	6	3	3	2	3,50
	4	5	5	4	4,50
	3	5	4	2	3,50
P _{2.3.}	3	3	4	2	3,00
	5	2	3	4	3,50
	3	3	4	4	3,50
P _{2.4.}	4	4	0	3	2,75
	3	0	5	4	3,00
	0	5	0	4	2,25

Keterangan :

P = Perbesaran 400 x

LP = Lapang Pandang

Lampiran 6.

Hasil analisis uji homogenitas variabel limfosit, makrofag dan sel plasma aktif

***** Analysis of Variance *****

36 cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.
 0 cases rejected because of missing data.
 12 non-empty cells.

1 design will be processed.

 Univariate Homogeneity of Variance Tests

Variable .. LIMFOSIT

Cochrans C(2,12) = .38776, P = .054 (approx.)
 Bartlett-Box F(11,399) = .56147, P = .860

 Univariate Homogeneity of Variance Tests

Variable .. MAKROFAG

Cochrans C(2,12) = .23780, P = .605 (approx.)
 Bartlett-Box F(11,399) = 1.14668, P = .323

 Univariate Homogeneity of Variance Tests

Variable .. P_AKTIF

Cochrans C(2,12) = .45578, P = .015 (approx.)
 Bartlett-Box F(11,399) = 1.33000, P = .205

Lampiran 7.

Hasil analisis uji t rerata jumlah limfosit antar perlakuan dosis dan waktu paparan benzopirin**** UJI-t ANTAR A**

=====

Sumber	X

A1-A2	0.336
p	0.738
A1-A3	5.944
p	0.000
A1-A4	7.290
p	0.000
A2-A3	5.608
p	0.000
A2-A4	6.954
p	0.000
A3-A4	1.346
p	0.188

=====

p = dua-ekor.

**** UJI-t ANTAR B**

=====

Sumber	X

B1-B2	9.130
p	0.000
B1-B3	15.346
p	0.000
B2-B3	6.216
p	0.000

=====

p = dua-ekor.

Lampiran 8.

Hasil analisis uji t rerata jumlah limfosit interaksi dosis dan waktu paparan benzopirin

** MATRIKS UJI-t INTER AB

A,B	1,1	1,2	1,3	2,1	2,2	2,3	3,1	3,2	3,3
1,1	0.000	-2.914	-3.108	-1.748	-5.633	1.943	-6.022	3.302	6.993
p	1.000	0.008	0.005	0.090	0.000	0.061	0.000	0.003	0.000
1,2	2.914	0.000	-0.194	1.166	-2.720	4.856	-3.108	6.216	9.907
p	0.008	1.000	0.842	0.254	0.012	0.000	0.005	0.000	0.000
1,3	3.108	0.194	0.000	1.360	-2.525	5.051	-2.914	6.410	10.101
p	0.005	0.842	1.000	0.184	0.018	0.000	0.008	0.000	0.000
2,1	1.748	-1.166	-1.360	0.000	-3.885	3.691	-4.274	5.051	8.742
p	0.090	0.254	0.184	1.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000
2,2	5.633	2.720	2.525	3.885	0.000	7.576	-0.389	8.936	12.627
p	0.000	0.012	0.018	0.001	1.000	0.000	0.703	0.000	0.000
2,3	-1.943	-4.856	-5.051	-3.691	-7.576	0.000	-7.965	1.360	5.051
p	0.061	0.000	0.000	0.001	0.000	1.000	0.000	0.184	0.000
3,1	6.022	3.108	2.914	4.274	0.389	7.965	0.000	9.324	13.015
p	0.000	0.005	0.008	0.000	0.703	0.000	1.000	0.000	0.000
3,2	-3.302	-6.216	-6.410	-5.051	-8.936	-1.360	-9.324	0.000	3.691
p	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.184	0.000	1.000	0.001
3,3	-6.993	-9.907	-10.101	-8.742	-12.627	-5.051	-13.015	-3.691	0.000
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	1.000
4,1	8.742	5.828	5.633	6.993	3.108	10.684	2.720	12.044	15.735
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.012	0.000	0.000
4,2	-6.993	-9.907	-10.101	-8.742	-12.627	-5.051	-13.015	-3.691	0.000
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	1.000
4,3	-8.353	-11.267	-11.461	-10.101	-13.987	-6.410	-14.375	-5.051	-1.360
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.184

p = dua-ekor.

Lampiran 9.

Hasil analisis uji t rerata jumlah makrofag antar perlakuan dosis dan waktu paparan benzopirin**** UJI-t ANTAR A**

=====

Sumber	X

A1-A2	-2.871
p	0.008
A1-A3	0.994
p	0.669
A1-A4	0.221
p	0.821
A2-A3	3.865
p	0.001
A2-A4	3.092
p	0.005
A3-A4	-0.773
p	0.547

=====

p = dua-ekor.

Lampiran 10.

Hasil analisis uji t rerata jumlah makrofag interaksi dosis dan waktu paparan benzopirin

** MATRIKS UJI-t INTER AB

A,B	1,1	1,2	1,3	2,1	2,2	2,3	3,1	3,2	3,3
1,1	0.000	-0.956	-4.591	-2.295	-5.164	-3.060	-2.678	-1.339	0.191
p	1.000	0.649	0.000	0.029	0.000	0.005	0.013	0.190	0.844
1,2	0.956	0.000	-3.634	-1.339	-4.208	-2.104	-1.721	-0.383	1.148
p	0.649	1.000	0.002	0.190	0.001	0.044	0.095	0.707	0.262
1,3	4.591	3.634	0.000	2.295	-0.574	1.530	1.913	3.252	4.782
p	0.000	0.002	1.000	0.029	0.578	0.136	0.065	0.004	0.000
2,1	2.295	1.339	-2.295	0.000	-2.869	-0.765	-0.383	0.956	2.487
p	0.029	0.190	0.029	1.000	0.008	0.542	0.707	0.649	0.019
2,2	5.164	4.208	0.574	2.869	0.000	2.104	2.487	3.825	5.356
p	0.000	0.001	0.578	0.008	1.000	0.044	0.019	0.001	0.000
2,3	3.060	2.104	-1.530	0.765	-2.104	0.000	0.383	1.721	3.252
p	0.005	0.044	0.136	0.542	0.044	1.000	0.707	0.095	0.004
3,1	2.678	1.721	-1.913	0.383	-2.487	-0.383	0.000	1.339	2.869
p	0.013	0.095	0.065	0.707	0.019	0.707	1.000	0.190	0.008
3,2	1.339	0.383	-3.252	-0.956	-3.825	-1.721	-1.339	0.000	1.530
p	0.190	0.707	0.004	0.649	0.001	0.095	0.190	1.000	0.136
3,3	-0.191	-1.148	-4.782	-2.487	-5.356	-3.252	-2.869	-1.530	0.000
p	0.844	0.262	0.000	0.019	0.000	0.004	0.008	0.136	1.000
4,1	5.738	4.782	1.148	3.443	0.574	2.678	3.060	4.399	5.929
p	0.000	0.000	0.262	0.002	0.578	0.013	0.005	0.000	0.000
4,2	0.574	-0.383	-4.017	-1.721	-4.591	-2.487	-2.104	-0.765	0.765
p	0.578	0.707	0.001	0.095	0.000	0.019	0.044	0.542	0.542
4,3	-1.148	-2.104	-5.738	-3.443	-6.312	-4.208	-3.825	-2.487	-0.956
p	0.262	0.044	0.000	0.002	0.000	0.001	0.001	0.019	0.649

p = dua-ekor.

Lampiran 11.

Hasil analisis uji t rerata jumlah sel plasma aktif antar perlakuan dosis dan waktu paparan benzopirin**** UJI-t ANTAR A**

=====

Sumber	X
A1-A2	-0.933
p	0.637
A1-A3	-0.350
p	0.729
A1-A4	0.816
p	0.573
A2-A3	0.583
p	0.572
A2-A4	1.750
p	0.090
A3-A4	1.166
p	0.254

=====

p = dua-ekor.

**** UJI-t ANTAR B**

=====

Sumber	X
B1-B2	2.121
p	0.042
B1-B3	5.859
p	0.000
B2-B3	3.738
p	0.001

=====

p = dua-ekor.

Lampiran 12.

Hasil analisis uji t rerata jumlah sel plasma aktif Interaksi dosis dan waktu paparan benzopirin

** MATRIKS UJI-t INTER AB

A,B	1,1	1,2	1,3	2,1	2,2	2,3	3,1	3,2	3,3
1,1	0.000	-3.030	-1.414	-2.020	-3.232	-0.808	-3.435	-2.020	0.404
p	1.000	0.006	0.167	0.052	0.004	0.568	0.002	0.052	0.692
1,2	3.030	0.000	1.616	1.010	-0.202	2.222	-0.404	1.010	3.435
p	0.006	1.000	0.116	0.324	0.836	0.034	0.692	0.324	0.002
1,3	1.414	-1.616	0.000	-0.606	-1.818	0.606	-2.020	-0.606	1.818
p	0.167	0.116	1.000	0.557	0.078	0.557	0.052	0.557	0.078
2,1	2.020	-1.010	0.606	0.000	-1.212	1.212	-1.414	0.000	2.424
p	0.052	0.324	0.557	1.000	0.236	0.236	0.167	1.000	0.022
2,2	3.232	0.202	1.818	1.212	0.000	2.424	-0.202	1.212	3.637
p	0.004	0.836	0.078	0.236	1.000	0.022	0.836	0.236	0.002
2,3	0.808	-2.222	-0.606	-1.212	-2.424	0.000	-2.626	-1.212	1.212
p	0.568	0.034	0.557	0.236	0.022	1.000	0.014	0.236	0.236
3,1	3.435	0.404	2.020	1.414	0.202	2.626	0.000	1.414	3.839
p	0.002	0.692	0.052	0.167	0.836	0.014	1.000	0.167	0.001
3,2	2.020	-1.010	0.606	0.000	-1.212	1.212	-1.414	0.000	2.424
p	0.052	0.324	0.557	1.000	0.236	0.236	0.167	1.000	0.022
3,3	-0.404	-3.435	-1.818	-2.424	-3.637	-1.212	-3.839	-2.424	0.000
p	0.692	0.002	0.078	0.022	0.002	0.236	0.001	0.022	1.000
4,1	6.061	3.030	4.647	4.041	2.828	5.253	2.626	4.041	6.465
p	0.000	0.006	0.000	0.001	0.009	0.000	0.014	0.001	0.000
4,2	-1.010	-4.041	-2.424	-3.030	-4.243	-1.818	-4.445	-3.030	-0.606
p	0.324	0.001	0.022	0.006	0.000	0.078	0.000	0.006	0.557
4,3	-2.020	-5.051	-3.435	-4.041	-5.253	-2.828	-5.455	-4.041	-1.616
p	0.052	0.000	0.002	0.001	0.000	0.009	0.000	0.001	0.116

p = dua-ekor.

Lampiran 13.

5.1 Preparasi Sediaan histopatologik Dengan Metode Parafin

Mencit yang telah diberi perlakuan, baik dengan paparan benzopirin maupun kontrolnya, pada akhir hari yang telah ditentukan dikorbankan dengan cara *decapitasie* atau teknik *single fixatif*, kemudian dilakukan pembedahan organ tubuh bagian dalam dan bagian usus dikeluarkan, selanjutnya dibersihkan dengan larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%) dan diambil usus bagian ileum kurang lebih 1 Cm sebelum usus buntu yang banyak mengandung Payer patch, dengan panjang kurang lebih 0,5 Cm. Pengambilan ileum dilakukan dengan menggunakan gunting bedah dan cutter yang tajam, selanjutnya dilakukan pemrosesan organ yang meliputi berbagai tahap antara lain.

1. Fiksasi

Fiksasi adalah suatu proses yang bertujuan untuk menghindarkan terjadinya perubahan post mortem, mengeraskan bahan sediaan agar mudah dilakukan pemotongan, membunuh kuman yang mungkin masih ada di dalam jaringan atau organ, menampilkan perbedaan refraksi komponen jaringan, serta meningkatkan afinitas jaringan terhadap zat warna. Dalam penelitian bahan fiksatif yang digunakan adalah buffer formalin 10%.

2. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan suatu proses yang dilakuakn dengan tujuan untuk menyerap atau menarik air dan sisa sisa air yang masih terdapat di dalam sel atau jaringan , secara perlahan lahan dan bertahap tanpa merubah struktur sel maupun jaringan, dan menggantinya dengan suasana alkohol, dilakukan dengan cara memasukkan jaringan ke dalam etanol dengan konsentrasi bertingkat, mulai dari konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95%, 96% dan 100% (etanol absolut).

3. Clearing

Clearing merupakan proses penjernihan yang dilakuakn dengan tujuan untuk penjernihan supaya jaringan menjadi transparan, serta mengganti suasana etanol dengan suasana minyak (Parafin) di dalam jaringan . Dalam penelitian ini bahan yang digunakan untuk clearing adalah xylol .

4. Impregnasi atau Infiltrasi

Proses ini bertujuan sebagai penyamaan keadaan jaringan dan pengisian pori-pori atau rongga kecil di dalam sel atau jaringan dengan parafin

5. Embedding

Merupakan suatu proses pembungkusan jaringan dengan parafin, menjadi suatu blok parafin yang cukup keras, sehingga mempermudah penyayatan atau

pemotongan jaringan dengan mikrotom. Proses ini bertujuan memberikan suatu penyangga agar jaringan dapat dipotong dengan menggunakan mikrotom tanpa menimbulkan distorsi yang cukup berarti, pada susunan sel dan jaringan.

6. Sectioning

Merupakan suatu proses pemotongan jaringan yang dilakukan dengan menggunakan mikrotom putar. Sebelum dilakukan pemotongan, organ yang sudah diblok di dalam parafin padat ditempelkan pada pegangan yang disebut dengan *holder* yang dipasang pada mikrotom. Hasil irisan yang disebut dengan *cuppies* atau *ribbon*, selanjutnya dibentangkan pada *water bath* yang sudah berisi air dengan suhu dibawah titik leleh parafin ($< 48\text{ C}$) agar jaringan mengembang dengan baik. Hasil sayatan diseleksi dan dipindahkan ke atas gelas obyek yang telah diolesi dengan *mayer albumin*, selanjutnya sediaan dimasukkan ke dalam oven dan dibiarkan kering di dalam oven dengan suhu $58\text{ C} - 60\text{ C}$ selama 30 menit. Sediaan yang sudah kering siap untuk dilakukan proses pewarnaan (Bancroft,1984; Martoprawiro,1996; Putra,1984).

7. Pewarnaan jaringan

Pada penelitian ini jaringan diwarnai dengan menggunakan pewarnaan HE (Haematoksilin Eosin), untuk komponen variabel limfosit dan makrofag di mana hasil yang diharapkan inti sel berwarna biru dan tampak butir butir

kromatin serta sitoplasma berwarna merah. Sedangkan untuk komponen variabel sel plasma aktif, jaringan diwarnai dengan menggunakan pewarnaan d-PAS (diastase Periodic Acid Schiff).

Lampiran 14

Prosedur Pewarnaan Jaringan Mukosa Ileum Mencit dengan metode pewarnaan HE (hematoksilin eosin)

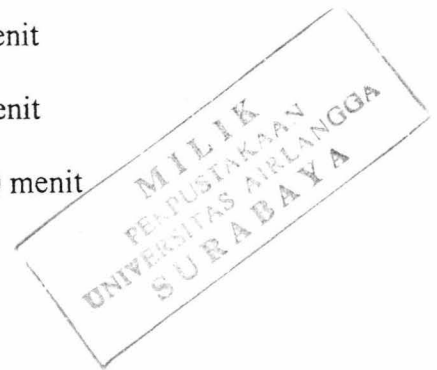
Prosedur pewarnaan jaringan dengan metode HE adalah sebagai berikut :

Proses Larutan	Waktu	
Deparafinisasi	Xilol I	5 menit
	Xilol II	5 menit
Hidrasi	Alkohol absolut	2 menit
	Alkohol 96%	2 menit
	Alkohol 95%	2 menit
	Alkohol 80%	2 menit
	Air mengalir	15 menit
Cat utama	Meyer haematoksilin	10 menit
	Air mengalir	15 menit
Cat pembanding	Eosin	1,5 menit
Dehidrasi	Alkohol 80 %	5 celup
	Alkohol 95 %	5 celup
	Alkohol 96 %	2 menit
	Alkohol absolut	2 menit
Clearing	Xilol	10 menit
	Xilol	5 menit
Mounting	Entellan	5 menit

Lampiran 15.**Prosedur pewarnaan Jaringan dengan menggunakan metode pewarnaan d PAS (diastase periodic acid schiff)**

Prosedur Pewarnaan jaringan dengan metode d PAS adalah sebagai berikut :

A. Deparafinisasi	Xilol I	5 menit
	Xilol II	5 menit
	Xilol III	5 menit
B. Hidrasi	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol 96%	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Alkohol 80%	3 menit
	Alkohol 70%	3 menit
C. Air		5 menit
D. PBS		5 menit
E. Inkubasi Larutan diastase 0,1% Pada suhu 37 C		5-30 menit
F. PBS		
	Air	
	Periodic Acid 0,5%	15-30 menit
G. PBS		
	Air	
	Schiff	15-30 menit



H. Cuci dengan Air		
	Harris haematoksilin	12 menit
I. Acid alkohol 1%		3 celup
J. Air		
	Amoniak air 0,2%	3 celup
K. Dehidrasi	Alkohol 80 %	5 menit
	Alkohol 95 %	5 menit
	Alkohol 96 %	5 menit
	Alkohol absolut	2 menit
L. Clearing	Xilol	10 menit
	Xilol	5 menit
M. Mounting	Entellan	5 menit
