

1. SMOKE
2. STRESS
3. IMMUNE RESPONSE

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Diterbitkan untuk
Ujian Tahap II

DISERTASI

**PENGARUH ASAP ROKOK DAN STRES
TERHADAP RESPON IMUN MENCIT**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



KK
DUS
DK K 26/02
Sum
p

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

SUMINTARTI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

1997

**PENGARUH ASAP ROKOK DAN STRES
TERHADAP RESPON IMUN MENCIT
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
di bawah pimpinan Rektor Universitas Airlangga
Prof.H. Soedarto, dr., DTM&H., PhD.
untuk dipertahankan di hadapan
Rapat Terbuka Senat Universitas Airlangga

Oleh :
SUMINTARTI
NIM : 099311474-D

Lembar Pengesahan

Disertasi ini telah disetujui
tanggal 24 September 1997

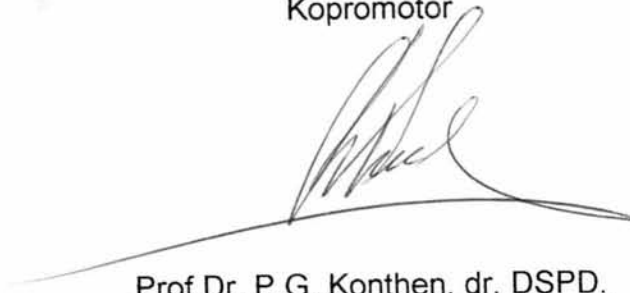
Promotor



Prof. Dr. Roemwerdiniadi S., dr. DSPA

NIP. 130 197 905

Kopromotor



Prof. Dr. P.G. Konthen, dr. DSPD.

NIP. 130 189 829

Telah diuji pada ujian tertutup
tanggal 24 September 1997

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof.Dr.Yoes Prijatna Dachlan, dr. M.Sc.

Anggota : 1. Prof.Dr.Roemwerdiniadi S, dr. DSPA
2. Prof.Dr.P.G. Konthen, dr. DSPD
3. Prof. Retno Laksminingsih, drg. MHPED
4. Prof.Dr.Thomas Kardjito, dr.
5. Dr.dr. Indro Handojo.
6. Kuntoro, dr. MPH., Dr.PH.
7. Sofia Mubarika, dr. M.Med.Sc., Ph.D.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga Surabaya
Nomor : 7685/J03/PP/1997
Tanggal : 2 Oktober 1997

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang yang telah memberikan limpahan rahmat dan karuniaNya sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Saya ucapkan banyak terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Tim Management Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Kepada Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H., Ph.D, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor ini. Serta kepada Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoema, dr. mantan Rektor Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk menempuh pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepada Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Sudijono, dr. dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya Prof. Dr. Soetarjadi, Apt. yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepada Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. H. Basri Hasanuddin, MA atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program doktor ini, serta dorongan spiritnya kepada saya guna menyelesaikan pendidikan ini.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin H. M. Hatta Hasan Sulle, drg. PhD, atas ijin yang diberikan untuk mengikuti program doktor.

Kepada Prof. Dr. Roemwerdiniadi Soedoko, dr. DSPA, yang telah berkenan menjadi promotor. Saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga, beliau selalu memberikan dorongan dan bimbingan untuk bekerja dan melaksanakan penelitian dengan cermat sampai saya menyelesaikan disertasi ini. Dengan dorongan dan bantuan beliau secara terus menerus sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Kepada Prof. Dr. PG. Konthen, dr. DSPD, yang berkenan menjadi Ko promotor saya ucapkan terima kasih yang tak terhingga beliau selalu memberi saran, bimbingan, masukan dan arahan yang sangat bermanfaat dalam penelitian sampai selesainya penulisan disertasi ini.

Kepada staf pengajar Program Pascasarjana UNAIR pada semester I dan II angkatan 1993 / 1994, Bapak Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr.; Prof. Abdoel Gani, SH, MS.; Prof. Poernomo Suryohudoyo, dr.; Prof. Eddy Pramono Soediby, dr., MPH.; Prof. Dr. Pitono Soeparto, dr, DSAK.; Prof. Dr. Thomas Kardjito, dr.; Prof. Dr. Noor Rahman, dr.; Prof. R. Rachmat Santoso, dr.; Prof. Dr. P.G. Konthen, dr.; Widodo JP, dr. MS. MPH. DrPh.; Fuad Amsyari, dr. MPH, PhD.; Dr. M. Zainuddin, Apt.; Prof. Dr. Yoes Prijatna Dahlan, dr. MSc.; Dr. Judajana, dr.; Dr. Sarmanu, drh. MS.; Dr. Suhartono Taat Putra, dr. MS.; Dr. Irwan Setiabudi, dr.; Prof. J. Glinka.; Dr. Julia Maria, drg. MS. dan Dr. Theodorus I Setiawan, dr. atas pengetahuan yang diberikan untuk menunjang disertasi saya.

Kepada Dr. Indro Handojo, dr., DSPK, atas bimbingan dan saran serta bantuan dalam bidang imunologi yang selalu beliau berikan sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian ini.

Kepada Widodo JP, dr., MS, MPH, DrPh. yang telah membantu dalam penyusunan metodologi penelitian untuk penyempurnaan disertasi ini.

Kepada Kepala Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Edijanto, dr. DSPK, atas izin untuk menggunakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.

Kepada Prof. Dr. FX. Budianto Suhadi, dr. DSPK, Dr. Irwan Setiabudi, dr. DSPK. Imam Rahayu, dr. DSPK. MSc. dari bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unair atas segala bantuannya selama penelitian ini.

Kepada Sofia Mubarika Haryana, dr. M.Med.Sc. PhD.; Dr. Wayan T Artama dari Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM Yogyakarta yang telah membantu penelitian saya dalam bidang Imunologi Seluler.

Kepada Kuntoro, dr. MPH. DrPh. yang telah memberikan masukan khususnya mengenai metodologi penelitian untuk penyempurnaan penulisan disertasi ini.

Kepada Dr. Achmad Basori, Apt. MS. yang telah banyak memberikan masukan dan saran pada waktu mengerjakan penelitian ini sehingga saya dapat menyelesaikannya.

Kepada Prof. Retno Laksminingsih S. drg. MHPed. atas bimbingan dan saran yang diberikan untuk penyempurnaan penulisan disertasi ini.

Kepada Prof. Agus Djamhuri, dr.; Dr. Mulyohadi Ali, dr., Aris Widodo, dr. MS, PhD., bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran UNIBRAW Malang, yang telah membantu dalam penggunaan alat pengasapan rokok dan memberikan masukan yang berhubungan dengan penelitian tentang rokok.

Kepada Ir. M Aries Purnomo, Ir. Taufik dan saudara Hendrik dari Jurusan Teknik Elektro Fakultas Teknologi Industri ITS yang telah membantu dalam menyiapkan alat *electric foot shock* pada mencit.

Kepada Tutik dan Ketut dari bagian Litbang Patologi Klinik RSUD. Dr. Soetomo Surabaya atas kerja keras yang diberikan dan bantuannya dalam pengujian laboratorik imunologi sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

Kepada Yayuk dari bagian Makmal Endokrinologi RSUD. Dr. Soetomo Surabaya yang telah membantu mengerjakan pengukuran kadar kortisol dalam serum mencit sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian ini.

Kepada seluruh jajaran Staf Administrasi Tata Usaha Program Pascasarjana Unair yang telah memberikan bantuan pelayanan selama saya mengikuti pendidikan program doktor.

Kepada Ir. Wahyu Budi Sugiharto yang telah banyak membantu dalam penggunaan alat-alat selama penelitian saya dan segala perhatian, dorongan, semangat dan doa yang diberikan selama melaksanakan penelitian dan penulisan disertasi, sehingga saya mampu untuk menyelesaikan disertasi ini.

Kepada Nirmala Kesumah, dr. MHA., yang selalu memberikan dorongan kepada saya guna menyelesaikan pendidikan doktor ini.

Secara khusus kepada kedua orang tua saya almarhum Ayahanda Soekirman Hartodiwiryono dan almarhumah Ibunda Syara yang telah mendidik dan membesarkan saya dengan penuh kasih sayang.

Kepada semua pihak yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu namanya, atas segala bantuan dalam bentuk karya maupun doa selama saya menempuh pendidikan doktor ini.

Akhirnya semoga Allah melimpahkan rahmat dan karuniaNya kepada semua pihak yang telah membantu saya dengan ikhlas dalam menyelesaikan disertasi ini. Amien

Kupersembahkan untuk :

Almamater

Guru-guru

Almarhum Ayah dan Ibu

Saudara dan teman-temanku

RINGKASAN

Penelitian eksperimental laboratorik pada mencit jantan digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian stresor asap rokok dan stres *electric foot shock* pada respon imun.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk melihat pengaruh pemberian stresor asap rokok dan stres *electric foot shock* serta gabungan keduanya pada mencit jantan BALB/C dalam terjadinya penurunan respon imun. Untuk maksud tersebut dilakukan pengujian laboratorik imunologik terhadap fungsi dan aktivitas komponen sistem imun mencit yang terlibat dalam respon imun nonspesifik dan respon imun spesifik baik seluler maupun humoral.

Penelitian eksperimental ini menggunakan rancangan penelitian yaitu modifikasi *The Separate Sample Pretest - Posttest Control Group Design*. Variabel bebas yang digunakan yaitu asap rokok kretek dan stres *electric foot shock* dan gabungan asap rokok dan stres *electric foot shock*. Variabel tergantung diukur setelah tujuh hari pemberian stresor berulang dengan dosis meningkat setiap hari. Variabel tergantung yang diukur yaitu sel fagosit neutrofil, komplemen, proliferasi limfosit T, dan limfosit B, sekresi IL-2, IFN γ , TNF α , oleh subset Th-1, sekresi IL-4 oleh subset Th-2 dan kadar sekresi hormon kortisol. Untuk melihat homogenitas data kelompok kontrol 1 (*pretest*) dan kontrol 2 (*posttest*) dari seluruh variabel tergantung digunakan uji T, kemudian digunakan analisa multivariat, univariat dalam pengolahan data statistik.

Hasil penelitian mengkonfirmasi 3 hipotesis penelitian ini diterima. Kelompok stresor asap rokok menurunkan respon imun dengan $p < 0.05$ dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok stres *electric foot shock* menurunkan respon imun dengan $p < 0.05$ dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok gabungan stresor asap rokok dan stres *electric foot shock*

secara kumulatif lebih menurunkan sel imunokompeten pada respon imun $p < 0.05$ bila dibandingkan dengan ketiga kelompok lainnya. Pengaruh peningkatan kadar hormon kortisol akibat pemberian stresor berpengaruh terhadap penurunan respon imun.

Implikasi dari penelitian ini memberikan informasi bahwa pengaruh stresor asap rokok dan stres *electric foot shock* atau bentuk stres - stres yang lain dapat menurunkan respon imun sehingga menimbulkan kerentanan untuk mendapat berbagai penyakit infeksi. Respon imun yang menurun akan menyebabkan penyakit infeksi berulang dalam derajat yang berat sehingga dapat berakibat fatal.

ABSTRACT

Key word : - cigarette smoke
 - electric foot shock stress
 - immune response

A laboratory experiment on animal was performed to observe effect of cigarette smoke stressor and electric foot shock stress on immune response of the male mice.

The objective of this study used modified separate sample pretest - posttest control group design. Independent variables in this study are cigarette smoke and electric foot shock stress and combine of cigarette smoke stressor and electric foot shock stress.

Five groups of 45 male mice BALB/C were separated using sample random sampling procedure and grouped as follows. First group of 9 male mice BALB/C was as a first control group. The second group was as a cigarette smoke stressor group. The third group was as an electric foot shock stress group. The fourth group was as a combine of cigarette smoke stressor and electric foot shock stress and the fifth group was as a second control group. The average weight of the mice is 30 - 35 gr. Seven days after treated with increasing dose of stress daily. Neutrophil, Complement, lymphocyte proliferation test of the lymphocyte T and B, IL-2, IFN Gamma, TNF Alpha, IL-4 and Cortisol as dependent variables were measured.

The result shows that the group of cigarette smoke stressor, electric foot shock stress and the combine of cigarette smoke stressor and electric foot shock stress were decreasing function and activity of immunocompetent cells on immune response compared with control group. The combine treatment of cigarette smoke stressor and electric foot shock stress showed the more suppressing of immunocompetent cells compared with the other's treatment group. Increasing plasma level Cortisol caused by stressor is influential in decreasing of the immune response.

Cigarette smoke stressor, electric foot shock and combine of cigarette smoke stressor and electric foot shock stress which were exposed by repeating and increasing dose during seven days at this study showed decreasing immune response.

DAFTAR ISI

	Hal
Daftar Isi	xii
Daftar Tabel	xvi
Daftar Gambar	xvii
Daftar Lampiran	xviii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Rokok	8
2.1.1 Asal Usul Merokok	8
2.1.2 Alasan Merokok	10
2.1.3 Perokok Pasif	11
2.1.4 Kandungan Asap Rokok	12
2.1.5 Ketergantungan Merokok	16
2.1.6 Merokok dan Kesehatan	18
2.1.7 Pengaruh Merokok terhadap jaringan di dalam rongga mulut.....	21
2.1.8 Pengaruh merokok terhadap Respon imun	23
2.2 Stres	25
2.2.1 Stres Secara Umum	25
2.2.2 Stres dan Merokok	29
2.2.3 Pengaruh Stres pada Respon Imun	33

2.2.4	Stres dan Konsep Psiconeuroimunologi	36
2.3	Sistem Imun	41
2.3.1	Sistem Imun Tubuh	41
2.3.2	Fungsi Sistem Imun	44
2.3.3	Sistem Imun Mencit	45
2.3.4	Respon Imun	47
2.3.5	Komponen Sel pada Respon Imun	51
2.3.6	Sitokin	56
2.3.7	Respon Imun Terhadap Imunogen	58
2.3.8	Imunomodulator	60
3.	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	63
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	63
3.2	Hipotesis	65
4.	METODA PENELITIAN	66
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	66
4.2	Sampel Penelitian	67
4.3	Tempat Penelitian	67
4.4	Besarnya Sampel	67
4.5	Identifikasi dan Pengukuran Variabel	68
4.5.1	Variabel Tergantung	68
4.5.2	Variabel Bebas	69
4.5.3	Variabel Kendali	69
4.6	Definisi Operasional	69
4.7	Bahan dan Alat Penelitian	70
4.7.1	Hewan Percobaan	70
4.7.2	Kandang Hewan Percobaan	71
4.7.3	Alat Stresor Asap Rokok	71
4.7.4	Alat Stresor <i>Electric Foot Shock</i>	71
4.7.5	Kandang Percobaan	72
4.7.6	Rokok Kretek	72

4.7.7	Pakan Hewan Percobaan	73
4.8	Tata Laksana Penelitian	73
4.9	Pengukuran Variabel Tergantung	75
4.9.1	Uji fagositosis sel granulosit dengan NBT (NitroBlueTetrazolium)	75
4.9.2	Pengujian Hemolitik Total Komplemen	77
4.9.3	Uji Proliferasi Limfosit T dan Limfosit B	79
4.9.4	Pengujian Terhadap IL-2	81
4.9.5	Pengujian terhadap Interferon Gamma (IFN γ)	82
4.9.6	Pengujian terhadap Tumor Necrosis Factor (TNF α).....	84
4.9.7	Pengujian terhadap IL-4	85
4.9.8	Pengukuran kadar Hormon Kortisol dalam serum Mencit	86
4.10	Analisis Data	87
4.11	Ringkasan Pelaksanaan Penelitian	88
5.	HASIL PENELITIAN	89
5.1	Hasil homogenitas data kelompok kontrol 1 dan kelompok kontrol 2 (pretest dan posttest).	89
5.2	Hasil uji masing-masing variabel terhadap keempat kelompok perlakuan	89
5.3	Perbedaan hasil pengaruh stres <i>electric foot shock</i> terhadap respon imun	94
5.4	Perbedaan hasil pengaruh stresor asap rokok terhadap respon Imun	95
5.5	Perbedaan hasil pengaruh gabungan antara stresor asap rokok dan stres <i>electric foot shock</i> pada respon imun	96
5.6	Perbedaan hasil pengaruh stres <i>electric foot shock</i> dan asap rokok terhadap respon imun	97
5.7	Perbedaan hasil pengaruh stres <i>electric foot shock</i> dan gabungan terhadap respon imun	98

5.8	Perbedaan hasil pengaruh stresor asap rokok dan gabungan terhadap respon imun.....	99
5.9	Hasil perbedaan pengaruh ke-empat perlakuan terhadap respon imun	100
6.	PEMBAHASAN	101
6.1	Pengaruh pemberian stresor pada fungsi Fagositosis Sel Granulosit.	107
6.2	Pengaruh pemberian stresor pada sistem Komplemen	111
6.3	Pengaruh pemberian stresor pada Proliferasi Limfosit T	114
6.4	Pengaruh pemberian stresor pada Proliferasi Limfosit B	117
6.5	Pengaruh pemberian stresor pada fungsi Lmfosit T-helper.....	119
6.5.1	Interleukin-2 (IL-2)	121
6.5.2	Interleukin-4 (IL-4)	122
6.5.3	Interferon Gamma (IFN g)	123
6.5.4	Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF a)	124
6.6	Parameter Hormon Kortisol sebagai Indikator Stres	125
7.	SIMPULAN DAN SARAN	129
7.1	Simpulan	129
7.2	Saran	130
	DAFTAR PUSTAKA.....	132
	LAMPIRAN	143



DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 2.1 Kandungan Asap rokok	13
Tabel 2.2 Ekuivalensi fungsional antara antigen permukaan sel manusia dan mencit, yang dideteksi dengan antibodi monoklonal.	47
Tabel 2.3 Beberapa tempat produksi, target dan efek interleukin	57
Tabel 5.1 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stres <i>electric foot shock</i> dan kelompok kontrol dengan terhadap variabel yang diteliti dan signifikasi perbedaannya	94
Tabel 5.2 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stresor asap rokok dan kelompok kontrol terhadap variabel yang diteliti dan signifikasi perbedaannya	95
Tabel 5.3 Perbedaan hasil pengaruh gabungan asap rokok dan stres dengan kelompok kontrol terhadap variabel yang diteliti dan signifikasi perbedaannya	96
Tabel 5.4 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stres <i>electric foot shock</i> dan kelompok asap rokok terhadap variabel yang diteliti dan signifikasi perbedaannya.	97
Tabel 5.5 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stres <i>electric foot shock</i> dan kelompok gabungan terhadap variabel yang diteliti dan signifikasi perbedaannya	98
Tabel 5.6 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stresor asap rokok dan kelompok gabungan terhadap variabel yang diteliti dan signifikasi perbedaannya	99
Tabel 5.7 Signifikasi perbedaan keempat kelompok perlakuan terhadap variabel yang diteliti	100

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1 Mekanisme stres dari <i>electric shock</i> dapat mengakibatkan imunosupresif.	28
Gambar 2.2 Mekanisme neural - neurohormonal oleh stres dan dan rokok (nikotin) dapat mempengaruhi sistem imun dan tumor	32
Gambar 5.1 Variabel granulosit terhadap keempat kelompok perlakuan ..	89
Gambar 5.2 Variabel komplemen terhadap keempat kelompok perlakuan	90
Gambar 5.3 Variabel Limfosit T terhadap keempat kelompok perlakuan ..	90
Gambar 5.4 Variabel Limfosit B terhadap keempat kelompok perlakuan ..	91
Gambar 5.5 Variabel IL-2 terhadap keempat kelompok perlakuan	91
Gambar 5.6 Variabel IL-4 terhadap keempat kelompok perlakuan	92
Gambar 5.7 Variabel IFN-Gamma terhadap keempat kelompok perlakuan	92
Gambar 5.8 Variabel TNF-Alpha terhadap keempat kelompok perlakuan	93
Gambar 5.9 Variabel kortisol terhadap keempat kelompok perlakuan ...	93

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1.1 Data variabel tergantung	143
Lampiran 1.2 Hasil Uji homogenitas kelompok kontrol 1 dan 2	144
Lampiran 1.3 Hasil uji ke-empat kelompok perlakuan terhadap variabel tergantung	149
Lampiran 1.4 Hasil uji kelompok kontrol dan kelompok asap rokok	150
Lampiran 1.5 Hasil uji kelompok kontrol dan kelompok stres <i>electric foot shock</i>	151
Lampiran 1.6 Hasil uji kelompok kontrol dan kelompok gabungan	152
Lampiran 1.7 Hasil uji kelompok stres <i>electric foot shock</i> dan kelompok asap rokok	153
Lampiran 1.8 Hasil uji kelompok stres <i>electric foot shock</i> dan kelompok gabungan	154
Lampiran 1.9 Hasil uji kelompok asap rokok dan kelompok gabungan	155

Bab 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pada kehidupan masyarakat sejak dahulu hingga saat ini kebiasaan merokok merupakan hal yang sangat umum. Hal ini disebabkan karena merokok bagi perokok dianggap memberi kenikmatan, mengurangi atau menghilangkan stres, merangsang timbulnya berbagai ide, menjernihkan pikiran dan menghangatkan suasana.

Pada umumnya mereka tidak menghiraukan pengaruh negatif yang ditimbulkan oleh kebiasaan merokok tersebut. Dunia kesehatan secara jelas menyatakan bahwa rokok memberi dampak negatif yang luas bagi kesehatan dengan meningkatkan angka kesakitan, kematian serta penderitaan umat manusia (Hoepoedio, 1985; Roem Soedoko, 1987).

Berbagai hasil penelitian ilmiah baik secara survei, klinis, epidemiologis maupun laboratoris menunjukkan bahwa kebiasaan merokok merupakan salah satu penyebab utama penyakit-penyakit seperti : bronkitis kronis, emphysema, kanker paru, kanker mukosa rongga mulut, tenggorokan, usofagus, buli-buli dan penyakit jantung koroner (Sulianti, 1984; Roem Soedoko, 1987).

Menurut data W.H.O, satu juta manusia pertahun di dunia meninggal karena merokok dan 95% di antaranya oleh karena kanker paru (Mackay, 1986). Kematian karena kanker paru, 50 % terjadi pada perokok pasif seperti janin dalam kandungan ibu perokok, anak-anak dari orang tua perokok dan orang dewasa bukan perokok yang berada dalam lingkungan perokok (Hirayama, 1988; Palfai, 1991).

Pada umumnya orang merokok dengan alasan untuk menghilangkan stres, maka semakin stres seseorang akan cenderung lebih banyak lagi rokok yang dihisap sehingga pengaruh negatif, terutama pengaruh nikotin semakin dirasakan pada perokok tersebut. Kebutuhan akan nikotin, yang merupakan salah satu komponen dalam asap rokok, diperkirakan yang menjadi penyebab dari kebiasaan merokok. Nikotin dalam dosis rendah menyebabkan eksitasi, yang dirasakan sebagai kenikmatan tetapi pada dosis yang tinggi menyebabkan inhibisi setelah eksitasi sepiantas, yang mendorong perokok ingin terus merokok (Comroe, 1960; Armitage, 1975; Benowitz, 1980).

Ketergantungan merokok dapat mempengaruhi respon imun melalui stresor dari komponen asap rokok dalam hal ini nikotin yang menyebabkan aktivasi neurohumoral yang mengakibatkan pelepasan hormon antara lain ACTH dan *glucocorticoid* (kortisol). Peningkatan

kortisol dalam darah akan menekan respon imun (Yasuda, 1985; Pomerleau, 1992). Perubahan respon imun akibat bermacam-macam stresor yang merupakan immunosupresor akan memudahkan tubuh terserang berbagai penyakit (Terr, 1991; Pinel, 1993).

Akibat adanya stres yang diperkirakan melalui hubungan antara sistem neuroendokrin dengan sistem imun akan mempengaruhi sel-sel imun adaptif dan natural baik lokal maupun sistemik (Felten, 1990). Sinyal dari sistem neuroendokrin dapat diterima dan mempengaruhi sistem imun, sebaliknya sel imun dapat mengirim sinyal dan diterima oleh sistem saraf (Schleifer, 1992). Setiap gangguan yang menyebabkan perubahan pada salah satu komponen akan diikuti perubahan pada komponen lain agar homeostatis terpelihara (Basedowsky, 1992; Felten, 1990). Kegagalan mempertahankan homeostasis dapat terjadi bila mekanisme integritas pengendalian secara normal saat itu tidak mampu bekerja dengan sempurna (Vander, 1990).

Konsep psikoneuroimunologi dapat menjelaskan fenomena-fenomena tersebut di atas yang merupakan suatu interaksi sistem saraf, endokrin dan sistem imun berhubungan dengan besarnya efek stres pada ketahanan tubuh dan usaha mempertahankan homeostasis tubuh (Carlson, 1994; Sigal, 1994). Tubuh dalam mempertahankan diri

akan melibatkan berbagai komponen, baik seluler, humoral, maupun mediator kimia yang merupakan komponen penting dari respon imun (Bellanti, 1985; Chandrasoma, 1991; Terr, 1991).

Respon imun pada hakekatnya merupakan kemampuan yang dimiliki tubuh untuk mempertahankan kondisi fisiologik. Kualitas ketahanan tubuh dapat diwujudkan oleh perubahan yang terjadi pada respon imun (Goodman, 1991; Terr, 1991). Stres akibat stressor dari komponen asap rokok dan bentuk stres yang lain akan menyebabkan perubahan kadar hormon stres, seperti ACTH dan kortisol (Berczi & Nagy, 1991).

Atas dasar berbagai kenyataan di atas maka peneliti ingin melakukan pengkajian lebih lanjut pengaruh asap rokok dan stres, dalam waktu yang bersamaan terhadap respon imun. Penelitian ini merupakan penelitian dasar (*Basic Research*) yang dikerjakan secara eksperimental laboratorik dengan menggunakan hewan coba mencit karena respon imun mencit hampir sama dengan respon imun manusia. Dengan demikian perlakuan yang diberikan kepada mencit dan hasil dari perlakuan tersebut yang didapatkan dalam penelitian ini diharapkan sesuai apabila perlakuan ini diterapkan pada manusia.

1.2 Rumusan Masalah

Dalam bidang kesehatan, berbagai penelitian tentang kebiasaan merokok dan bahaya yang ditimbulkan oleh kebiasaan tersebut telah diteliti, baik secara klinis, epidemiologis maupun laboratoris. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kebiasaan merokok menyebabkan bermacam-macam penyakit kanker dan penyakit jantung koroner.

Pada umumnya motif orang merokok adalah untuk kenikmatan, menghilangkan stres dan ketergantungan terhadap nikotin. Semakin stres seseorang, semakin banyak rokok yang dihisap dalam upaya menghilangkan stres. Keadaan stres yang terus menerus dapat menekan respon imun, sehingga memungkinkan tubuh terserang berbagai penyakit.

Dari masalah yang ada serta dari tinjauan kepustakaan dapat dikemukakan rumusan masalah.

Apakah asap rokok dan stres secara kumulatif dapat menurunkan respon imun mencit.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan bahwa pengaruh asap rokok dan stres keduanya dapat menurunkan respon imun.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Membuktikan dan menganalisis pengaruh asap rokok terhadap sel-sel imunokompeten pada respon imun natural dan respon imun adaptif baik seluler maupun humoral.
- b. Membuktikan dan menganalisis pengaruh stres *electric foot shock* terhadap sel-sel imunokompeten pada respon imun natural dan respon imun adaptif baik seluler maupun humoral.
- c. Membuktikan dan menganalisis pengaruh gabungan asap rokok dan stres *electric foot shock* terhadap sel-sel imunokompeten pada respon imun natural dan respon imun adaptif baik seluler maupun humoral.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini dapat mengungkap mekanisme perubahan respon imun secara komprehensif akibat stresor dari asap rokok kretek dan stres *electric foot shock*.

2. Dari hasil penelitian ini akan didapat informasi ilmiah bahwa asap rokok dan stres mempunyai efek kumulatif terhadap penekanan respon imun.
3. Respon imun mencit hampir sama dengan respon imun manusia maka perlakuan yang diberikan kepada mencit dan hasil dari perlakuan tersebut yang didapatkan dalam penelitian ini diharapkan sesuai apabila perlakuan ini diterapkan pada manusia, karena perlakuan ini dari sudut etis tidak mungkin dilakukan, terutama stres dari *electric foot shock*. Dengan demikian hasil penelitian ini tidak dapat ditransformasikan pada manusia secara langsung, tetapi dapat diasumsikan bahwa akan terjadi respon imun yang sama apabila perlakuan diaplikasikan pada manusia.

Bab 2

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1 Rokok

2.1.1 Asal usul merokok

Merokok mempunyai sejarah yang panjang dan sangat bervariasi. Kata *tobacco* (tembakau) yang merupakan bahan utama dari rokok berasal dari kata Indian *tobago*. Orang Indian dari benua Amerika dikenal sebagai orang pertama yang menanam dan menggunakan tembakau untuk dirokok, dihisap dan dikunyah. Tembakau adalah tanaman genus *Nicotiana* dan termasuk keluarga *Solonaceae*. Pada tahun 1550, pelaut yang pulang dari Dunia Baru (Amerika) membawa dan memperkenalkan tembakau ke Spanyol, Portugis, kemudian menjalar ke negara-negara lain. Tembakau pada tahun 1565 diperkenalkan di Inggris, dan dari sana dengan cepatnya menyebar ke daratan Eropa, sedangkan negara-negara Rusia, Turki, Persia, Afrika, Filipina, Jepang dan Tiongkok baru mengenal rokok pada permulaan abad 17.

Di Indonesia sendiri tidak diketahui dengan pasti, kapan rokok mulai diperkenalkan. Setelah abad ke-17, pemakaian

tembakau meluas dan mempunyai arti yang cukup penting dalam dunia perdagangan. Tembakau mempunyai peranan yang cukup strategis dalam penghasilan negara di Indonesia. Tembakau merupakan salah satu sumber penerimaan dalam negeri yaitu cukai, maupun sebagai salah satu komoditi ekspor nonmigas. Industri tembakau sangat besar dalam penyerapan tenaga kerja, artinya mulai dari penanaman sampai pengolahannya di pabrik hingga menjadi rokok banyak memerlukan tenaga kerja. Serta tidak melupakan penghasilan para petani tembakau (Imam, 1991).

Tembakau digunakan dalam bentuk rokok sigaret, cerutu, tembakau pipa dan sebagai bubuk cerutu. Di Indonesia dikenal beberapa macam sigaret antara lain rokok putih, rokok kretek, rokok kelembak, rokok kemenyan dan lain-lain. Pada proses pembuatan rokok untuk menghilangkan rasa pahit dari tembakau yang berlebihan serta menimbulkan aroma yang menyegarkan telah ditambah bermacam-macam rempah, antara lain bumbu kimiawi, cengkeh, kelembak, kemenyan. Sejak awal abad ke-20 terjadi perubahan cara merokok di mana orang lebih menyukai merokok sigaret dari pada menghisap cerutu, pipa atau menghisap bubuk tembakau dengan demikian maka menyebar luaslah kebiasaan merokok. Hal ini ditunjang oleh industri rokok yang dalam



pariwaranya selalu mengetengahkan bahwa perokok nampak lebih jantan, tampan dan sehat, sehingga kebiasaan merokok dengan cepat melanda dunia, tak ubahnya dengan epidemi. Kebiasaan merokok menjalar dari satu negara ke negara lain, dari satu benua ke benua lain, bahkan antara kelompok masyarakat yang berbeda dalam satu negara. Kebiasaan merokok menjadi sesuatu yang dapat dinikmati oleh umat manusia di seluruh penjuru dunia, bahkan siap dinikmati kapan saja dan oleh siapa saja (Roem Soedoko, 1987; Palfai, 1991).

2.1.2 Alasan Merokok

Alasan orang merokok dapat bermacam-macam. Pada umumnya pria merokok untuk mempertinggi *positive feelings* yaitu memberikan kenikmatan, mengurangi ketegangan, memberi inspirasi serta mengakrabkan suasana. Sering kali rokok menjembatani perkenalan dan persahabatan terutama dengan suku-suku yang terisolir hidupnya. Alasan dari wanita merokok yaitu untuk mengurangi *negative feelings* yaitu ketegangan kecemasan serta kesedihan, dan remaja merokok pada umumnya untuk kebanggaan atau simbol status. Untuk golongan sosio-ekonomi lemah di mana cara - cara mengurangi ketegangan dengan rekreasi tak dapat dilakukan, maka merokok merupakan salah satu

cara untuk menghibur diri dan mengurangi rasa lapar. Selain itu umumnya alasan merokok sebagai sesuatu yang dapat menyenangkan dan membuat relaks. Merokok sering juga dihubungkan dengan kemampuan bermasyarakat dan dijadikan kekuatan penopang dalam situasi bermasyarakat, misalnya perokok mungkin seorang pemalu yang perlu mengambil tindakan tertentu untuk menutupi perasaan malunya di hadapan orang lain (Roem, 1987; Bloom, 1988; McManus, 1992).

Alasan merokok bagi anak muda sebagian beranggapan bahwa merokok merupakan salah satu lambang kedewasaan ataupun kematangan, karena mereka telah mengerjakan hal yang biasa dikerjakan orang dewasa. Tak dapat diingkari bahwa iklan juga mempunyai pengaruh yang besar terutama pada anak muda. Seringkali iklan menggunakan tokoh olahragawan, bintang film atau pria tampan dan wanita cantik hingga mereka membayangkan kesuksesan tersebut erat hubungannya dengan merokok.

2.1.3 Perokok Pasif

Orang yang bukan perokok, tetapi berada di sekitar perokok dan ikut menghirup asap rokok beserta zat-zat yang terkandung di dalamnya disebut perokok pasif. Keadaan ini biasanya terjadi di

ruangan umum yang tertutup seperti gedung bioskop, ruangan kantor dan tempat yang berada dalam lingkungan perokok. Asap yang dihasilkan dari rokok, ditambah dengan asap yang dihembuskan oleh perokok sendiri mengandung zat-zat kimia yang lebih tinggi daripada yang dihisap oleh perokok (Repace & Lowrey, 1980; Matsukura, 1984).

Efek samping asap rokok yang merugikan bagi perokok pasif yaitu dapat meningkatkan resiko terjadinya penyakit-penyakit paru dan kanker, seperti halnya yang terjadi pada perokok dengan segala akibat-akibat yang tidak berbeda termasuk dalam kelompok perokok pasif antara lain adalah janin dalam kandungan ibu perokok, anak-anak dari orang tua perokok, orang dewasa bukan perokok yang berada dalam lingkungan perokok (Hirayama, 1988; Palfai, 1991).

2.1.4 Kandungan Asap Rokok

Asap rokok mengandung bahan-bahan kimia lebih daripada 4000 macam, merupakan campuran yang terdiri dari bentuk partikel padat dan bentuk gas (Palfai, 1991). Beberapa efek pada jaringan tubuh dari campuran bahan-bahan kimia yang ada dalam kandungan asap rokok terdapat pada tabel di bawah ini (Holbrook, 1994).

Tabel 2.1 : Kandungan Asap rokok

Bahan	Efek
<u>Bahan Partikel</u>	
Tar	Karsinogen
Hidrokarbon Polinuklir Aromatik	Karsinogen
Nikotin	Stimulator, Depresor Ganglionik
Fenol	Karsinogen dan Iritan
Kresol	Karsinogen dan Iritan
b. Naftilamin	Karsinogen
N. Nitrosonornikotin	Karsinogen
Benso (A) Pirin	Karsinogen
Logam Nikel, Arsenik, Polonium	Karsinogen
Indole	Akselerator Tumor
Karbasol	Akselerator Tumor
Katekol	Kokarsinogen
<u>Bahan Gas</u>	
Karbonmonoksida	Gangguan transport dan Penggunaan oksigen
Asam Hidrosianik	Siliotoksin dan Iritan
Asetaldehid	Siliotoksin dan Iritan
Akrolein	Siliotoksin dan Iritan
Amonia	Siliotoksin dan Iritan
Formaldehid	Siliotoksin dan Iritan
Oksida-Oksidanitrogen	Siliotoksin dan Iritan
Nitrosamin	Karsinogen
Hidrasin	Karsinogen
Vinilclorida	Karsinogen

Di antara sekian banyak bahan kimia di dalam asap rokok, tiga yang paling berbahaya yaitu :

a. Tar

Tar terbentuk selama pemanasan tembakau. Tar merupakan kumpulan berbagai zat kimia yang berasal dari daun tembakau sendiri, maupun yang ditambahkan dalam proses pertanian dan industri sigaret. Tar adalah hidrokarbon Aromatik Polisiklik yang ada dalam asap rokok, tergolong zat karsinogen yaitu zat yang dapat menumbuhkan kanker. Kadar tar yang terkandung dalam asap rokok inilah yang berhubungan dengan resiko timbulnya kanker (Hirayama, 1988; Palfai, 1991).

b. Nikotin

Nikotin adalah bahan alkaloid toksis yang terdapat dalam tembakau. Banyak sigaret berisi kira-kira 8 - 9 mg nikotin, perokok umumnya mendapatkan 1 - 3 mg nikotin. Nikotin diabsorpsi melalui paru-paru dan kecepatan absorpsinya hampir sama dengan masuknya nikotin secara intra vena. Nikotin masuk ke dalam otak dengan cepat dalam waktu kira-kira 10 detik, dapat melewati barrier di otak dan diedarkan ke seluruh bagian otak, kemudian menurun secara cepat, setelah beredar ke seluruh bagian tubuh dalam waktu 15 - 20 menit pada waktu

pengisapan terakhir dari sigaret. Efek bifasik dari nikotin pada dosis rendah menyebabkan rangsangan ganglionik yang merupakan eksitasi, tetapi pada dosis tinggi menyebabkan blokade ganglionik setelah eksitasi sepiintas (Palfai, 1991; Claire, 1992; Holbrook, 1994; Henningfield, 1995).

Pada perokok sigaret, kadar nikotin dalam darah naik secara cepat dan mencapai puncaknya pada waktu selesai merokok. Nikotin pada dosis rendah, seperti pada keadaan merokok, efek kardiovaskular nampaknya melalui sistem saraf pusat. Akibatnya terjadi rangsangan simpatik dengan meningkatnya tekanan darah dan denyut jantung. Pada dosis yang lebih tinggi nikotin dapat bekerja langsung pada sistem saraf perifer, menimbulkan rangsangan ganglionik dan pelepasan katekolamin. Dengan dosis yang sangat tinggi, nikotin dapat menyebabkan hipotensi dan menurunnya denyut jantung melalui blokade ganglionik perifer, efek depresi langsung melalui kerja di otak (Benowitz, 1980). Dosis letal dari nikotin 40 - 60 mg yang dapat membunuh dalam menit.

c. Karbon monoksida

Karbon monoksida merupakan gas beracun yang tidak berwarna, kandungannya di dalam asap rokok 2 - 6 %. Karbon

monoksida dari asap masuk ke dalam darah pada paru-paru mempunyai daya pengikat (afinitas) dengan Hb sekitar 200 kali lebih kuat dari pada daya ikat Oksigen (O_2) dengan Hemoglobin (Hb), mempunyai *half life* (waktu paruh) 4- 7 jam dalam tubuh. Sebanyak 10 % dari seluruh Hb dapat ditemukan terisi oleh karbon monoksida (CO) dalam bentuk COHb (Carboxy Hemoglobin), tidak dapat membawa Oksigen, maka akibatnya sel darah merah akan kekurangan Oksigen, yang akhirnya sel tubuh akan kekurangan oksigen. Pengurangan oksigen jangka panjang dapat menyebabkan pembuluh darah akan terganggu karena jadi menyempit dan mengeras. Bila hal ini menyerang pembuluh darah jantung akan terjadi serangan jantung (Palfai, 1991; Holbrook, 1994; Henningfield, 1995).

2.1.5 Ketergantungan Merokok

Merokok sigaret merupakan suatu ketergantungan obat (Henningfield, 1995). Ketergantungan yaitu dapat berupa ketergantungan fisik dan psikis. Sejumlah laporan dikumpulkan dari data yang menunjukkan bahwa nikotin yang terdapat dalam tembakau mengakibatkan ketergantungan menurut kriteria yang ditentukan oleh World Health Organization (WHO) sebagai berikut.

- a. Nikotin mengakibatkan toleransi dalam dosis.
- b. Menunjukkan aktivitas psikis di mana perokok ingin mempertahankan kebutuhan dari nikotin yang diinginkan.
- c. Nikotin menunjukan pola yang mendorong dalam penggunaannya sehingga perokok tidak dapat berhenti merokok.
- d. Kecenderungan untuk menghasilkan perilaku *relaps*.

Ketergantungan merokok diperkuat oleh kerja langsung dari nikotin pada otak dan kebutuhan nikotin yang berjalan terus. Diantara efek-efek nikotin yang ada adalah kemampuan menghasilkan perubahan *mood* untuk sementara membuat perokok lebih banyak merokok pada waktu stres, sehingga perokok yang ingin berhenti merokok sering *relaps* bila berada dalam keadaan stres. Nikotin merupakan obat psikoaktif yang kuat (Henningfield, 1995; Claire 1992).

Pemberian nikotin dapat menyebabkan toleransi dan ketergantungan fisik. Toleransi menunjukkan penurunan respon imun setelah pemberian dosis berulang dari nikotin, sehingga diperlukan peningkatan dosis yang lebih tinggi untuk mencapai hasil seperti pemberian dosis sebelumnya.

2.1.6 Merokok dan Kesehatan

Merokok dipandang dari segi ekonomi dianggap membantu meningkatkan pemasukan negara, tetapi dari segi kesehatan dengan jelas dinyatakan bahwa merokok dapat merugikan kesehatan. Hal ini telah dibuktikan dengan begitu banyak penelitian. Dari hasil penelitian yang ada, belum ada satu penelitianpun yang menemukan bahwa merokok tidak merugikan kesehatan.

Merokok dapat menyebabkan penyakit yang cukup serius dan menimbulkan bermacam-macam problem di bidang kesehatan. Dari berbagai penelitian yang ada menunjukkan fakta-fakta bahwa kebiasaan merokok merupakan salah satu penyebab utama penyakit-penyakit seperti bronkitis kronis, emphysema, kanker paru, kanker mukosa rongga mulut, tenggorokan, usofagus, buli-buli dan penyakit jantung koroner (Sulianti, 1984; Roem, 1987).

Terdapat bukti-bukti lain yang juga ikut mempengaruhi resiko terhadap timbulnya penyakit tersebut di atas yaitu.

- a. Cara menghisap rokok sigaret mempunyai resiko yang terbesar, lebih-lebih yang tidak diberi filter dibandingkan dengan cerutu dan pipa.
- b. Umur dimulainya merokok : makin muda, resiko makin besar.
- c. Banyaknya batang dan dalamnya menghisap rokok perhari.
- d. Cara meletakkan rokok pada mulut.
- e. Panjang puntung rokok, makin pendek makin memberi resiko lebih besar oleh karena 50 % dari tar terkumpul dalam 1/3 batang rokok terakhir.
- f. Adanya faktor resiko lain seperti polusi, faktor genetik dan pekerjaan.

Di negara yang kebiasaan merokok sudah mengakar cukup lama, sekitar 90 - 95 % kematian akibat kanker paru, 80 - 85 % penderita radang saluran pernapasan kronis, adalah akibat merokok dan 20 - 25 % kematian akibat jantung koroner dan stroke disebabkan oleh pengaruh rokok. Demikian pula bermacam-macam bahaya kesehatan lainnya, termasuk penyakit-penyakit saluran pernapasan yang lain, tukak lambung dan komplikasi-komplikasi dari kehamilan adalah juga diakibatkan oleh kebiasaan merokok. Efek yang merugikan dari merokok pada kehamilan yaitu aborsi

spontan, kurangnya berat badan bayi yang lahir, kelahiran sebelum waktunya dan bayi yang lahir mati (Claire, 1996).

Perokok yang menghirup asap rokok, pengaruhnya secara langsung pada paru-paru. Kandungan asap rokok antara lain Tar dan bahan-bahan iritan yang lain dalam asap dapat menyempitkan jalan udara dan menyebabkan sekresi mukus yang tidak semestinya (Palfai, 1991).

Akibat patofisiologik dari penggunaan tembakau menyebabkan perubahan pada jaringan tubuh yang memperbesar terjadinya kanker, penyakit jantung koroner, penyakit-penyakit saluran pernapasan dan ketergantungan. Gangguan-gangguan ini tidak dapat dipungkiri disebabkan oleh pemaparan asap rokok tembakau yang merupakan faktor penyebab utama dalam etiologi penyakit tersebut (Henningfield, 1995).

Pengaruh merokok terhadap timbulnya kanker disebabkan oleh endapan dari bahan-bahan karsinogen dalam jaringan-jaringan yang terkena kanker dalam tubuh. Beberapa bahan karsinogen yang ada dalam asap rokok diabsorpsi oleh paru-paru dan dipindahkan ke bagian-bagian lain kemudian akan memulai kanker pada

jaringan-jaringan yang lain dalam tubuh. Penyakit-penyakit kronis kardiovaskular dan serebrovaskular akibat pengaruh merokok disebabkan oleh bahan-bahan dalam asap rokok yang melewati paru-paru dan dilarutkan dalam darah, menyerang haemoglobin (Hb), platelet, jaringan-jaringan vaskular dan denyut jantung (Claire, 1992).

Dewasa ini sekitar 3 juta kematian tiap tahun akibat penyakit yang berkait dengan merokok di seluruh dunia. Diperkirakan akan meningkat dari 3 juta menjadi 10 juta pada tahun 2020, kalau kebiasaan merokok yang sekarang ini tetap tidak berkurang. Makin muda usia seseorang memulai merokok dan dalamnya hisapan asap rokok waktu merokok, maka makin besar dampak negatif merokok terhadap kesehatannya (Claire, 1992).

2.1.7 Pengaruh merokok terhadap jaringan di dalam rongga mulut

Rongga mulut adalah tempat kontak yang pertama dari asap hasil pembakaran rokok. Iritasi yang berlangsung lama dan terus menerus menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas seluler epitel mukosa rongga mulut. Akibatnya terjadi perubahan epitel serta penambahan produksi bahan keratin, terutama pada mukosa

pipi dan dasar mulut. Perubahan pada mukosa mulut dapat terlihat sebagai bercak putih yang disebut Leukoplakia merupakan lesi praganas di dalam mulut. Perubahan mukosa ini tidak menimbulkan rasa sakit, sehingga tidak diperhatikan sampai keadaan menjadi lanjut. Pada umumnya kanker di dalam rongga mulut dimulai dengan perubahan mukosa (Bastian & Reade, 1976; Pindberg 1980).

Kebiasaan merokok sebagai salah satu faktor predisposisi untuk terbentuknya stain pada permukaan gigi, dan berakibat warna gigi dapat berubah dari kecoklatan hingga kehitaman oleh karena kandungan tar dalam rokok yang menyebabkan permukaan gigi menjadi kasar sehingga plak lebih mudah terbentuk. Plak dalam perjalanannya akan berlanjut menjadi kalkulus. Pada subgingiva kalkulus dapat mengiritasi jaringan gingiva dan menyebabkan gingivitis, yang merupakan awal dari kerusakan jaringan periodontium.

Pada perokok cenderung deposit kalkulus lebih banyak daripada yang tidak merokok. Selain itu asap dari hasil pembakaran rokok menyebabkan gangguan sirkulasi darah ke gusi, sehingga gusi rentan terhadap infeksi. Akibat merokok dapat mempengaruhi timbulnya penyakit ANUG (*Acute Necrotizing Ulcerative Gingivitis*)

(Christen 1970; Bastian & Reade, 1976). Beberapa faktor yang mendukung perkembangan ANUG adalah stres, merokok kebersihan mulut jelek (Johnson & Engel, 1986). Keterlibatan stres dan merokok sebagai faktor pendukung menyebabkan gingival ischemia yang merupakan awal dari ANUG (Schluger, 1990).

2.1.8 Pengaruh Merokok terhadap Respon Imun.

Merokok merupakan suatu cara yang unik untuk masuknya obat ke dalam tubuh. Aktivitas merokok selalu dihubungkan dengan kandungan asap rokok yang terdiri dari begitu banyak bahan-bahan kimia, termasuk beberapa yang aktif secara farmakologik, antigenik, sitotoksik, mutagenik, dan karsinogenik. Efek-efek biologik yang bermacam-macam ini memberikan suatu kerangka untuk pengertian dari akibat-akibat yang merugikan dari merokok (Holbrook, 1994).

Respon yang diberikan terhadap masuknya bahan-bahan asing ke dalam tubuh dinamakan respon imun. Tujuan respon imun tersebut adalah dalam upaya mempertahankan homeostasis, dalam hal ini homeostasis ketahanan tubuh (Vander, 1985). Ketahanan tubuh pada hakekatnya merupakan kemampuan yang dimiliki tubuh untuk mempertahankan kondisi fisiologik. Berdasarkan konsep

imunologik dikenal dua macam ketahanan tubuh, yaitu ketahanan tubuh natural dan ketahanan tubuh adaptif. Kualitas ketahanan tubuh dapat terlihat oleh perubahan yang terjadi pada respon imun (Goodman, 1991).

Gangguan respon imun akan memudahkan tubuh terserang berbagai penyakit. Bahan-bahan kimia yang terkandung dalam asap rokok terutama bahan karsinogen yang dihirup pada waktu merokok akan menekan respon imun sehingga memungkinkan timbulnya kanker. Berbagai macam penyakit dapat ditimbulkan oleh kebiasaan merokok, dan yang bertanggung jawab terhadap ketergantungan pada rokok adalah nikotin yang terdapat dalam tembakau. Nikotin juga dapat meningkatkan hormon kortisol dalam darah. Akibat peningkatan hormon kortisol dalam darah akan menyebabkan penekanan respon imun (Holbrook, 1994; Henningfield, 1995).

Penelitian tentang pengaruh asap rokok yang dilakukan oleh Djamhuri (1989), yaitu pemaparan asap rokok dilakukan dengan alat Wright, konstruksi sendiri yang memungkinkan AAU (Asap Aliran Utama) yaitu, asap yang dihasilkan sewaktu rokok dihisap, langsung mengalir di depan lubang hidung mencit. Penghisapan rokok selama 20 detik, setiap kali diberi interval 1 menit dan

diulang sebanyak 4 kali. Rata-rata waktu pemaparan dalam alat penghisap antara 6 - 7 menit. Setelah selesai pemaparan diberikan udara segar. Setiap hari diberikan 7 kali perlakuan hasil pemeriksaan setelah 2 minggu pemaparan dengan asap rokok kretek menunjukkan adanya proliferasi epitel bronkus terminalis (DJamhuri, 1986).

2.2 STRES

2.2.1 Stres secara umum

Stres merupakan fenomena umum. Istilah stres biasanya dihubungkan pada perubahan fisik atau psikologik yang dapat mengganggu keseimbangan atau homeostasis (Akil, 1995). Stres juga digunakan secara luas untuk menggambarkan respon emosional dan biologik terhadap situasi yang mengancam (Riley, 1981). Kejadian apa saja yang dapat mengakibatkan peningkatan sekresi kortisol disebut stres (Sigal, 1994; Vander, 1994).

Stres menyebabkan sekresi *Corticotropin Releasing Hormon* (CRH) dari *hipothalamus* melalui sirkulasi portal mencapai hipofise yang merangsang sel cortitroph mensekresi *Peptide Propiomelanocortin* (POMC) yang menghasilkan antara lain ACTH

dan β Endorpin. ACTH mengirim tanda ke kortek adrenal yang mensekresi kortisol (Akil, 1995). Kadar kortisol yang tinggi mempunyai pengaruh fisiologik yang luas, seperti penekanan pada fungsi imun dan hal ini merupakan faktor yang penting dalam perkembangan penyakit-penyakit keganasan (Mcmanus, 1992). Percobaan pada binatang, diketahui stres dapat mempercepat perkembangan sel kanker dan meningkatkan metastasis. Pada penelitian tentang sekresi ACTH dan kortisol diketahui, bahwa sekresi ACTH tikus sangat cepat, kadar di plasma tertinggi dicapai pada 3 menit, sedang kortisol belum mencapai kadar maksimal pada 30 menit setelah mendapat stres tunggal. Pada stres yang berulang, terjadi peningkatan kortisol setelah 1 jam dan mulai normal kembali setelah 8 jam. Pada stres berulang, bila tidak terjadi peningkatan stres maka akan terjadi adaptasi, sehingga tidak menimbulkan respon (Young & Akil, 1985).

Pemberian rangsang fisik yang berulang pada sistem tubuh akan menyebabkan proses adaptasi yang mencerminkan peningkatan kemampuan fungsional. Tetapi jika besarnya rangsang tidak cukup untuk proses pembebanan tubuh, maka tidak akan terjadi proses adaptasi, sebabnya bila rangsang terlalu besar yang tidak dapat ditoleransi oleh tubuh akan mengakibatkan jejas dan

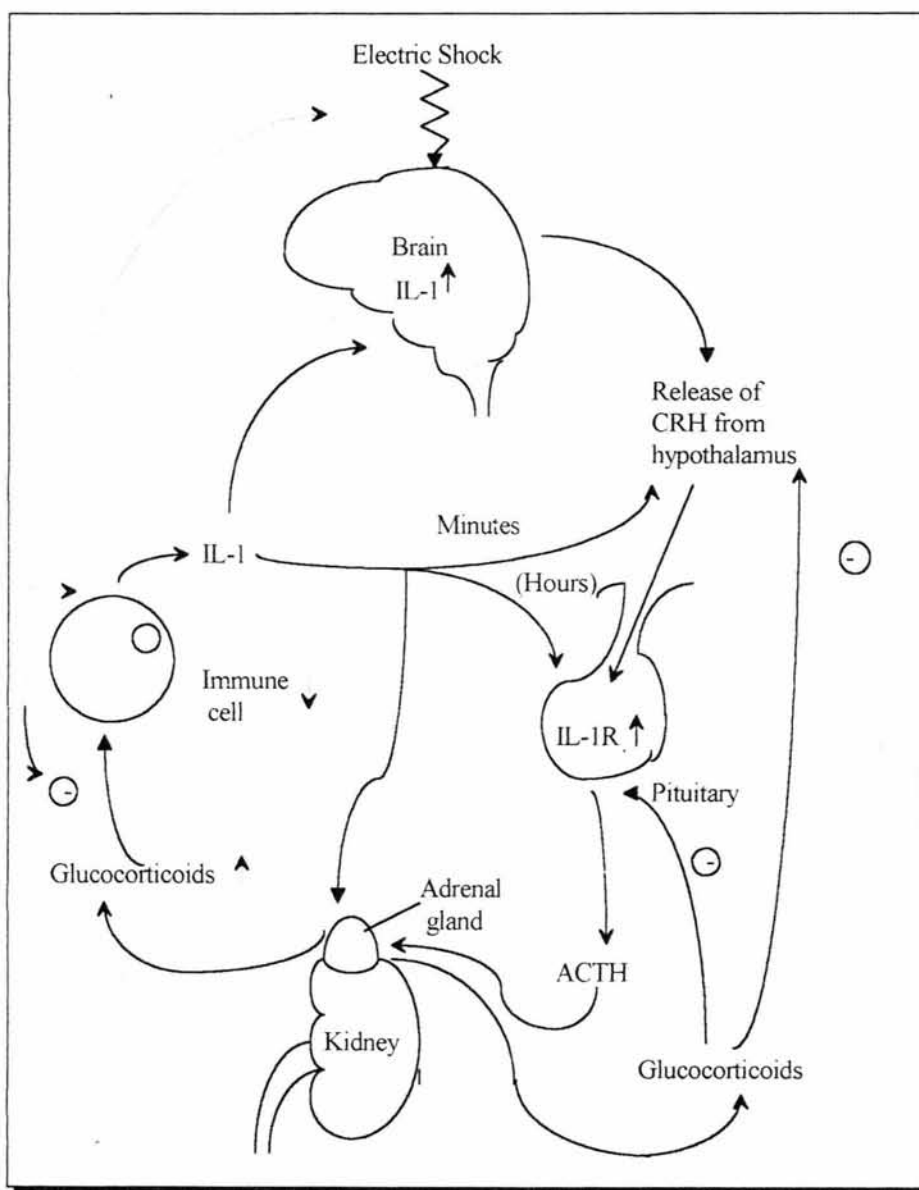
mengganggu keadaan homeostasis pada sistem tubuh. Beban rangsang fisik yang demikian itu dinamakan stresor.

Hormon glukokortikoid mempunyai efek terhadap monosit dan makrofag. Monosit dan makrofag mempunyai peranan sentral sebagai sel APC yang akan menginduksi respon imun humoral dan respon imun seluler. Monosit dapat memproduksi IL-1 dan TNF. Kadar hormon glukokortikoid yang tinggi akan menekan produksi IL-1 dan TNF yang mengakibatkan limfosit T tidak dapat memproduksi IL-2 dan IFN- γ , tetapi produksi IL-4 tidak terpengaruh sehingga limfosit B dapat berdiferensiasi menjadi sel plasma. Adanya IL-4 akan merangsang pembentukan humoral antibodi (Ader, 1991).

Hormon glukokortikoid akan menekan sistem imun melalui penekanan sistem imun seluler dan humoral yaitu lewat sistem imun adaptif seluler seperti Th1 dan Th2. Adanya hormon glukokortikoid yang terus menerus akan menghambat maturasi sel limfosit T dan apoptosis kelenjar timus (Roitt, 1993; Kuby, 1994).

Penekanan sistem imun atau imunosupresi akibat stres dari *electric shock* dapat menimbulkan pelepasan IL-1 dalam otak yang selanjutnya merangsang CRH dari hipotalamus dan pada akhirnya

akan terjadi immunosupresi seperti yang dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 2.1 Mekanisme stres dari *electric shock* dapat mengakibatkan immunosupresi (Sumber : Blalock, 1994)

2.2.2 Stres dan merokok

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kombinasi stres psikologik dan merokok menimbulkan efek aditif pada pelepasan kortisol (Pomerleau, 1990). Respon merokok terjadi di bawah kondisi untuk mengurangi kecemasan. Salah satu komponen dari asap rokok yaitu nikotin dapat mengurangi kecemasan sebagai suatu penguat negatif untuk perilaku merokok.

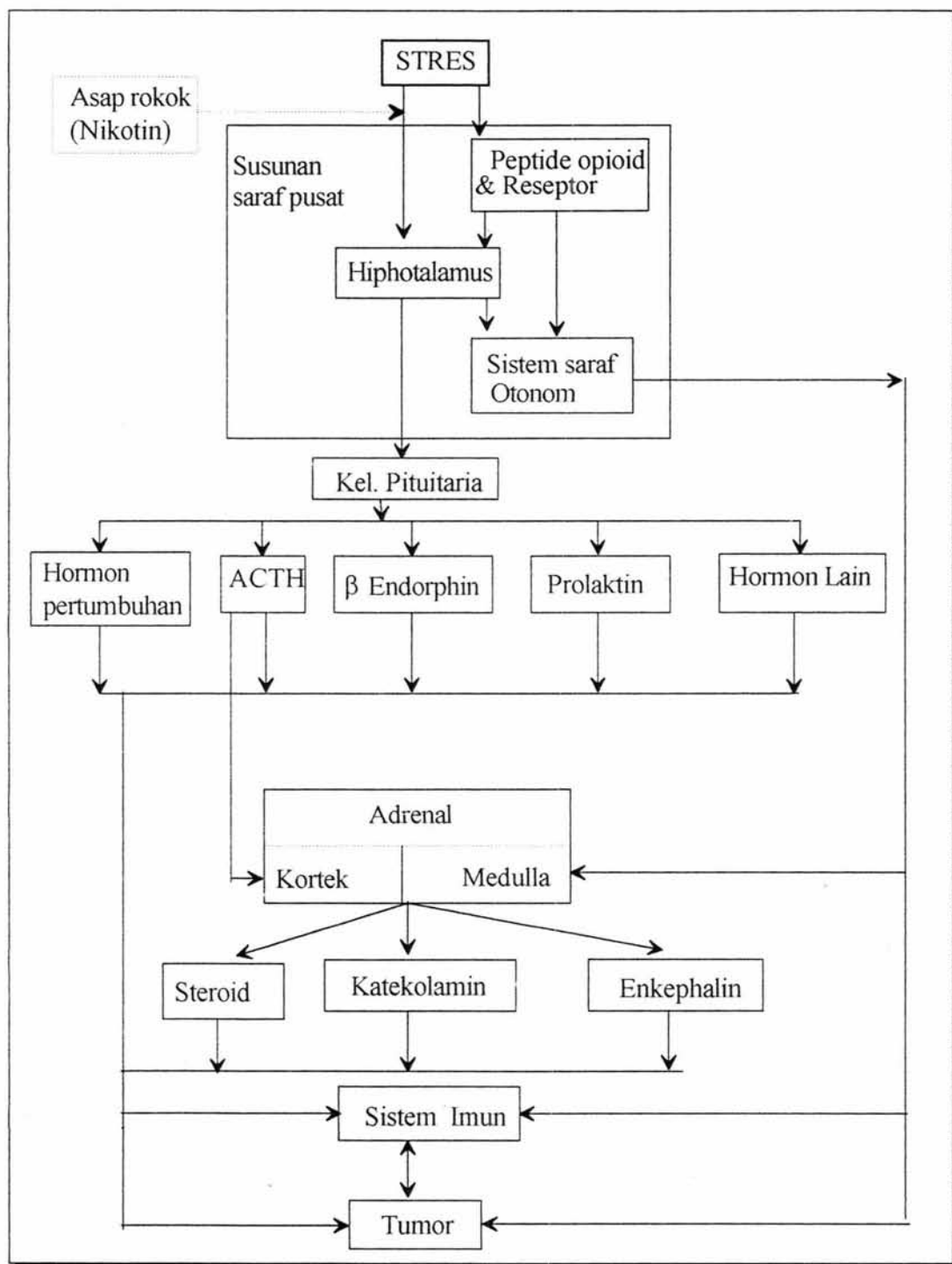
Interaksi antara stres dan merokok dalam hubungannya dengan peningkatan *intake* nikotin pada waktu stres, menggambarkan kompensasi perilaku untuk mengurangi kepekaan terhadap nikotin bilamana aktivitas kortikosteroid ditingkatkan oleh stresor, sehingga perokok lebih banyak merokok di bawah kondisi stres (Pomerleau, 1990; Sheahan & Garrity, 1992).

MacDougall (1983), menunjukkan bahwa stres dan merokok menimbulkan efek aditif pada denyut jantung. Kemudian, MacDougall (1986) menyatakan bahwa cukup kuat hubungan antara stres dan merokok bagi tekanan darah sistolik dan diastolik, fenomena ini adalah suatu mekanisme umum (Pomerleau, 1990).

Pada keadaan stres terjadi peningkatan kortisol yang akan memberikan penurunan ketahanan tubuh, sehingga keadaan ini dapat menyebabkan kerentanan terhadap infeksi, kanker dan penyakit otoimun (Miller, 1989 ;Schleifer;1992). Pemberian nikotin melalui merokok dapat meningkatkan hormon kortisol dalam darah, akibatnya akan menekan respon imun yang memungkinkan timbulnya berbagai macam penyakit yaitu penyakit kardiovaskular, penyakit jantung koroner, serebrovaskular, atherosklerosis dan hipertensi. Nikotin selain meningkatkan sekresi hormon kortisol juga menunjukkan peningkatan konsentrasi glukose serum, asam lemak bebas, vasopresin dan β endorpin (Claire, 1992; Holbrook, 1994; Henningfield, 1995).

Pada keadaan stres yang disertai dengan peningkatan intensitas merokok akan memperbesar perubahan-perubahan yang terjadi pada fungsi sistem ketahanan tubuh. Stres dapat dihubungkan dengan meningkatnya resiko kanker, di samping itu merokok juga mempunyai resiko timbulnya bermacam-macam kanker, sehingga interaksi gejala-gejala dari stres dan merokok akan meningkatkan resiko terjadinya kanker (Irwin, 1995).

Stres dapat mengaktifkan sistem hipofisis adrenal. Pengaktifan ini melalui neuropeptida hipotalamus disebut *corticotropin releasing factor* (CRF) (Yasuda, 1985). Stres fisik dan psikologik yang mengenai tubuh akan memberikan respon biologis pada sistem saraf. Respon sistem saraf tersebut dapat melalui sekresi neurohumoral. Salah satu contoh alur sistem saraf dan hormon adalah hipotalamus - hipofisis- adrenal. Stres fisik dan psikologik keduanya dapat menimbulkan aktivitas biologik tubuh, termasuk respon imun (Virus, 1985; Martin, 1987; Miller, 1989; Basedowsky, 1992). Dengan demikian mekanisme neural-neurohormonal oleh stres dan nikotin dari asap rokok mempengaruhi sistem imun dan tumor yang dapat terlihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Mekanisme Neural - neurohormonal oleh stres dan asap rokok (nikotin) dapat mempengaruhi sistem imun dan tumor (Sumber : Shavit, 1991).

2.2.3 Pengaruh stres pada respon imun

Stres dapat mempengaruhi respon imun melalui hubungan interaksi antara sistem neuroendokrin dengan sistem imun, sehingga stres dikategorikan sebagai modulator sistem imun (Blalock, 1985; Miller, 1989). Akibat stres baik stres fisik, stres psikososial, stres lingkungan dan stres mikrobiologis dapat menyebabkan keluarnya hormon glukokortikoid melalui aksis hipotalamus kelenjar pituitari dan kelenjar adrenal. Hasil penelitian pada manusia menunjukkan bahwa stres ternyata dapat menyebabkan beberapa macam penyakit, proses hipersensitif dan lebih mudah terinfeksi virus dan bakteri. Penelitian pada mencit menunjukkan bahwa stres ternyata dapat meningkatkan kadar hormon ACTH dan kortisol. Kortisol mempunyai reseptor hormon pada permukaan sel-sel limfoid. Akibat ikatan hormon glukokortikoid melalui reseptor hormon akan mengeluarkan Hsp 90 (*Heat shock protein*) dan oleh akseptor nuklearnya dibentuk mRNA yang menyampaikan pesan untuk mengeluarkan protein tertentu. Protein tertentu tersebut akan menghambat produksi IL-2, IL-3 dan IFN- γ begitu pula produksi TNF (*Tumor Necrosis Factor*) oleh makrofag juga dihambat (Munk, 1990). Akibat lain dari stres yang diperkirakan melalui hubungan sistem neuroendokrin akan mempengaruhi sel-sel imun adaptif dan imun natural (Felten, 1990).

Beberapa hormon seperti golongan steroid, hormon pertumbuhan, tiroksin, adrenalin berpengaruh terhadap ekspresi dan reaksi limfosit dan monosit melalui beberapa *transmitter*. Hormon steroid, endorpin dan enkapsalin yang terbentuk selama stres akan menekan sistem imun sehingga memudahkan terjadinya infeksi (Ader, 1991; Roitt, 1993; Sigal, 1994). Hormon kortikosteroid mempunyai mekanisme kerja yang mempengaruhi kecepatan sintesis protein. Molekul hormon berdifusi memasuki sel membran plasma, kemudian bereaksi dengan reseptor protein yang dalam sitoplasma sel dan membentuk kompleks reseptor steroid. Kompleks ini mengalami perubahan konformasi dan bergerak menuju nukleus dan berikatan dengan kromatin. Ikatan ini menstimulasi transkripsi RNA dan sintesis protein spesifik. Induksi sintesis protein ini merupakan perantara efek fisiologis steroid.

Pada beberapa jaringan seperti hati, hormon steroid merangsang transkripsi sel dan mensintesis protein spesifik, sedang pada jaringan limfoid dan fibroblas, hormon ini dapat bersifat katabolik. Beberapa peneliti menyatakan bahwa hormon steroid merangsang sintesis protein yang sifatnya menghambat atau toksik terhadap sel-sel limfoid, hal itulah yang mungkin merupakan efek kataboliknya.

Kortikosteroid bersifat immunosupresif melalui beberapa cara yaitu bersifat toksik pada beberapa sel limfoid. Hormon kortikosteroid juga menurunkan fungsi makrofag sehingga kurang tanggap terhadap sitokin yang ada (Ader, 1991).

Peningkatan hormon kortikosteroid (kortisol) akibat berbagai stresor pada akhirnya akan menyebabkan immunosupresi. Banyak bentuk stresor (pekerjaan bertambah, temperatur yang tinggi, kegaduhan, pembedahan) jika keadaan ini diperpanjang dan berat akan menimbulkan perubahan-perubahan fisiologik seperti yang digambarkan oleh Hans Selye bahwa bentuk respon adaptasi tubuh dapat berupa fenomena *General Adaptation Syndrome (GAS)*, yang mendasari konsep respon fisiologis tubuh terhadap stres. Respon GAS meliputi tiga tahap yaitu tahap shock (*the alarm reaction*), tahap adaptasi dan tahap kelelahan. Pada tahap kelelahan di bawah kondisi tertentu dapat terjadi gangguan-gangguan fisik yang kemudian stres dan dapat menyebabkan penyakit (Bloom, 1988; McManus, 1992; Blalock, 1994).

Penelitian pada tikus dengan cara *electric foot shock* sebesar rata-rata 1.6 mA yang dilakukan 8 atau 16 *shock* dengan interval 4

menit untuk, 1, 3 atau 5 *session* sehari hasilnya terjadi penekanan aktivitas sel limfosit setelah 3 atau 5 hari (Lyte, 1987)

2.2.4 Stres dan Konsep Psikoneuroimunologi

Pengaruh sistem saraf dan hormon terhadap ketahanan tubuh menimbulkan konsep neuroimunologik dan imunoneuro endokrinologik, sedang konsep psikoimunologik menunjukkan bahwa fenomena stres, perilaku dan status emosi dapat mempengaruhi ketahanan tubuh (Maddox, 1984; Martin, 1987; Falaschi, 1994). Bentuk komplementasi perilaku melalui neurohormonal pada ketahanan tubuh menimbulkan konsep psikoneuroimunologik (Basedowsky, 1992). Komunikasi dan interaksi di antara sistem saraf, endokrin dan sistem imun merupakan tiga sistem terpenting yang memelihara fungsi homeostasis tubuh (Jarvis, 1990).

Stresor psikis dan fisis yang diterima tubuh akan menyebabkan hipotalamus-hipofisis anterior mensekresi ACTH. Sekresi ACTH dapat merangsang korteks adrenal mensekresi kortisol (Wilson, 1992; Sigal, 1994; Akil, 1995). Secara umum sekresi ACTH dan kortisol ke dalam darah dikenal sebagai indikator stres tubuh (Sandi, 1992; Fricchione, 1994).

Integritas pengendalian tubuh antara alur hipotalamus hipofisis adrenal dengan sistem ketahanan tubuh merupakan bagian dari mekanisme homeostasis tubuh (Vander, 1990; Sternberg, 1992). Rangsangan pada hipotalamus akan menimbulkan berbagai sekresi neurohormonal melalui alur *hypothalamus - pituitary - adrenal* (HPA) *axis* (Gaudin, 1989; Henry, 1993; Carlson, 1994). Alur HPA dapat menunjukkan pengendalian terhadap hormon glukokortikoid dan hormon seks - steroid. Bentuk alur HPA merupakan dasar utama sistem interaksi imunoneurohormonal yang sangat peka terhadap berbagai bentuk stres. Dengan demikian sistem saraf pusat merupakan titik tangkap terhadap beban stres fisis dan stres psikis, dapat diwakili oleh parameter ACTH dan kortisol (Bieliauskas, 1987; Cohen, 1987; Daleva, 1987; Basedowsky, 1992; Henry, 1993; Greenspan, 1994).

Interaksi sistem saraf dan neurohormonal terhadap sistem ketahanan tubuh, bukan satu arah, tetapi mekanisme tersebut dapat menunjukkan bentuk mekanisme alur ganda (Blalock, 1985; Joseph, 1985). Neuroendokrin dapat mempengaruhi sistem imun melalui reseptor yang dimiliki sel imunokompeten, sedangkan mekanisme umpan baliknya dimungkinkan oleh sekresi hormon dan

limfokin oleh sel imunokompeten yang dapat mempengaruhi sistem saraf (Blalock, 1985).

Bentuk interaksi lain, antara sistem saraf pusat terhadap komponen imunologik dapat ditunjukkan melalui respon ACTH dan kortisol, setelah pemberian iL-1, sedangkan kedua hormon tersebut dapat pula menekan sekresi IL-1 dan IL-2. Dengan demikian, hubungan interaksi timbal balik tersebut dapat diproyeksikan pada stres yang dapat mensekresi ACTH maupun kortisol (Ohgo, 1991; Basedowsky, 1992; Neveu, 1992). Selain itu, inervasi saraf terhadap jaringan limfoid sekunder menyebabkan sekresi beberapa neurotransmitter neuropeptida ataupun substansi kimia lain.

Ada komunikasi biokimia dua arah secara langsung antara sistem neuroendokrin dengan sel imun melewati neurotransmitter, hormon dan sitokin. Interaksi limfosit dengan neuropeptida dan nonpeptida berlangsung di kelenjar limfoid atau pada saat melewati sirkulasi portal antara hipotalamus dan hipofise. Kelenjar limfoid primer maupun sekunder diinervasi oleh saraf simpatis nonadrenergik dan serabut yang mengandung neuropeptida. Limfosit dapat menerima langsung sinyal ketika berinteraksi dengan norepinefrin yang dikeluarkan ujung saraf (Irwin, 1992). Limfosit

selain mengekspresikan berbagai reseptor sehingga dapat berintegrasi dan menerima sinyal langsung, juga dapat menghasilkan hormon, neurotransmitter yang berfungsi otokrin, parakrin maupun endokrin (Blalock, 1994). Dengan demikian disimpulkan bahwa sinyal dari sistem neuroendokrin dapat diterima langsung dan mempengaruhi sistem imun. Sebaliknya sel imun dapat mengirim sinyal dan diterima oleh sistem saraf.

Konsep psikoneuroimunologi dapat menerangkan fenomena-fenomena tersebut di atas sebagai suatu keseimbangan jaringan, dan interaksi antara sistem imun neuroendokrin yang memelihara fungsi homeostasis tubuh. Rangsangan stres terhadap respon neuroendokrin ditujukan untuk pemeliharaan homeostasis. Sinyal dan mekanisme dari aktivasi neuroendokrin selama stres sangat diperlukan untuk modulasi selektif dari respon fisiologik dan patologik (Vigas, 1996). Dengan demikian setiap gangguan yang menyebabkan perubahan pada salah satu komponen akan diikuti perubahan pada komponen lain agar homeostasis tetap terpelihara. Kegagalan mempertahankan homeostasis akan memudahkan terjadinya penyakit. Konsep psikoneuroimunologi berdasarkan pada fenomena bahwa stres mempengaruhi respon imun (Ader, 1991).

Gangguan respon imun yang merupakan bentuk ketahanan tubuh akan memudahkan tubuh terserang berbagai penyakit.

Indikator yang dapat menunjukkan efektivitas fungsi sistem ketahanan tubuh adalah sel imunokompeten yang ditetapkan dengan dua cara yaitu :

- a. berdasarkan kuantitas atau perhitungan jumlah limfosit T, limfosit B dan Sel NK (Natural Killer), kadar sitokin serta antibodi dalam darah, dan
- b. berdasarkan kualitas atau fungsi dari sel imunokompeten misalnya kemampuan proliferasi dari limfosit bila dirangsang oleh mitogen, aktivitas fagositik dan kemampuan membentuk antibodi.

Pada penelitian respon imun banyak ditujukan untuk mengetahui fungsi sistem ketahanan tubuh yang dinilai sebagai fungsi homeostasis. Integrasi dari fungsi sistem neuroendokrin dan sistem imun merupakan fungsi homeostasis. Penilaian fungsi ketahanan tubuh adalah penilaian interaksi antara sel imunokompeten (Taylor, 1996).

2.3 Sistem imun

2.3.1 Sistem imun tubuh.

Di dalam tubuh terdapat sel - sel dan molekul yang tersebar di seluruh tubuh yang dikelompokkan di dalam suatu sistem yang disebut sistem limforetikular. Sistem ini merupakan jaringan atau kumpulan sel, seperti kelenjar limfe, limpa, sumsum tulang, timus dan jaringan limfoid yang dihubungkan dengan mukosa dari gastrointestinal (saluran cerna) dan traktus respiratorius (saluran napas). Seluruh sel dari sistem imun berasal dari pluripoten stem cells di sumsum tulang. Sistem imun yang terdiri dari bermacam-macam sel dapat menunjukkan respon terhadap suatu rangsangan sesuai dengan sifat dan fungsi masing-masing (Stites, 1991; Roitt, 1993).

Dalam menghadapi serangan mikroorganisme, manusia secara alamiah dilengkapi dengan sistem imun yang dapat membedakan bahan milik sendiri (*self*) dengan bahan asing atau dianggap asing (*non-self*) sebagai pertahanan tubuh. Sistem pertahanan tubuh ini berada dalam keseimbangan dengan mikroorganisme di sekelilingnya agar tetap sehat. Apabila mikroorganisme berhasil melumpuhkan sistem pertahanan tubuh, maka tubuh menjadi sakit

atau timbul penyakit infeksi. Bahan yang asing bagi tubuh (bagian dari mikroorganisme) disebut antigen atau disebut juga dengan imunogen, karena dapat menimbulkan respon imun adaptif (Bellanti, 1993). Selain dari faktor-faktor konstitusional yang menentukan seseorang menjadi rentan, atau kebal terhadap penyakit tertentu, di dalam tubuh manusia terdapat sistem imun natural dan sistem imun adaptif. Di dalam menimbulkan hasil akhir berupa eliminasi bahan asing maupun imunitas kedua sistem imun ini yaitu sistem imun natural dan adaptif tidak bekerja sendiri-sendiri, melainkan bekerja saling berkaitan dan saling mempengaruhi. Ciri khas dari sistem imun adaptif adalah adanya spesifisitas, diversitas, terbentuknya sel *memory* dan kemampuan untuk membedakan *self* dan *nonself* (Stites, 1991; Bellanti, 1993; Roitt, 1993).

Ada dua sistem pertahanan tubuh terhadap invasi bahan asing.

- a. Sistem pertahanan tubuh alamiah (*Innate immunesystem / natural / nonspesifik*), mempunyai kemampuan bekerja secara spontan terhadap bahan asing, tanpa memerlukan pengenalan terlebih dahulu, tidak membedakan terhadap bahan asing dan tidak membentuk sel *memory*. Yang tergolong dalam sistem pertahanan tubuh alamiah di antaranya ialah :

1. pertahanan anatomik seperti : air liur, air mata, sekresi mukus,
 2. pertahanan fisiologik seperti : pH lambung, lisosim, komplemen,
 3. pertahanan melalui fagositik / endositik oleh sel neutrofil, eosinofil, dan makrofag,
 4. pertahanan melalui respon inflamasi,
 5. sitotoksitas oleh sel *Natural Killer* (NK),
 6. mediator aktif yang larut seperti Interferon-beta, Tumor necrosis factor, suatu sitokin yang dilepas oleh sel makrofag.
- b. Sistem Pertahanan tubuh yang didapat (*adaptive immune system / spesifik*), dapat mengenal bahan asing secara spesifik dan mengeleminasi secara selektif. Ciri khasnya adalah adanya spesifitas, diversitas, terbentuknya sel *memory* dan kemampuan untuk membedakan *self* dan *non-self*. Yang tergolong dalam sistem pertahanan tubuh yang didapat adalah populasi limfosit T dan limfosit B bersama dengan sel-sel penyaji antigen APC (*antigen presenting cell*). Sel efektor limfosit T adalah subpopulasi limfosit T-helper (CD4⁺), limfosit T-sitotoksik (CD8⁺) dan limfosit T-supresor. Fungsi efektor dari limfosit

T-helper (TH) adalah mensekresi berbagai limfokin yang dapat mempengaruhi fungsi dan aktivitas sel-sel imunokompeten yang lain. Sel T-helper baru dapat bekerja apabila berikatan dengan sel penyaji antigen (APC). APC adalah sel-sel yang dapat melakukan fagositosis/ internalisasi antigen, menghancurkan dan mempresentasikannya bersama molekul MHC kelas II, yang kemudian akan dikenali oleh limfosit T-helper melalui reseptor yang berada dipermukaan sel TCR (*T-cell receptor*) yang membentuk kompleks dengan molekul CD3. Ikatan antara kompleks MHC kelas II : peptida dari APC dengan kompleks TCR CD3 dari limfosit T-helper, akan mengaktifkan limfosit T-helper untuk mensekresi berbagai limfokin. Jenis limfokin yang disekresi tergantung pada subset limfosit T-helper yang mensekresi: subset limfosit T-helper 1 (TH1) akan mensekresi IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-12, sedangkan subset limfosit T-helper 2 (TH2) akan mensekresi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (Abbas, 1994; Kuby, 1994; Sigal,, 1994; Roitt, 1994).

2.3.2 Fungsi Sistem Imun

Sistem imun mempunyai 3 fungsi utama, yaitu : pertahanan (proteksi), keseimbangan (homeostasis), dan perondaan (*immune surveillance*). Fungsi pertahanan dari sistem imun ditujukan

terhadap antigen dari luar, misalnya : invasi mikroorganisme, virus, bakteri, jamur dan parasit ke dalam tubuh. Fungsi homeostasis dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan umum dari semua organisme multiseluler yang menghendaki selalu terjadinya bentuk uniform dari setiap jenis sel tubuh. Untuk memperoleh keadaan keseimbangan tersebut terjadilah proses degradasi dan katabolisme yang bersifat normal agar komponen yang sudah tua, rusak dan tidak terpakai lagi dapat dieliminasi dari dalam tubuh, misalnya proses pembersihan sel eritrosit dan leukosit yang telah habis masa hidupnya. Fungsi perondaan (*immune surveillance*) dilakukan di seluruh bagian tubuh dengan maksud untuk mengetahui, memantau dan mengenal sel tubuh yang berubah menjadi abnormal melalui mutasi (Stites, 1991; Kuby, 1992) .

2.3.3 Sistem imun mencit

Digunakan mencit sebagai hewan percobaan karena 60 - 80 % hewan percobaan untuk uji biologik menggunakan mencit terutama yang berasal dari *out bred strain* (Hume, 1972), dengan alasan :

- a. tubuhnya kecil, sehingga tidak banyak memerlukan ruang pemeliharaan dan konsumsi makanan,
- b. mudah beradaptasi dengan kandang dan lingkungan sekitarnya,

- c. harganya murah, dan
- d. sistem imun mencit sudah lebih banyak diketahui dibandingkan dengan hewan percobaan lain (Hudson & Frank, 1976).

Sejak 1966, Claman dan kawan-kawan menemukan konsep seluler untuk membedakan subpopulasi sel - T pada mencit dan sejak itu mencit digunakan sebagai model untuk meneliti sistem imun seluler pada manusia (Clamen, 1987).

Antigen permukaan sel limfosit mencit yang pertama kali ditemukan adalah antigen Theta yang kemudian dikenal dengan nama Thy - 1. Antigen ini hanya didapatkan pada sel-T, dan tidak pada sel B. Antigen yang terdapat pada semua sel limfosit mencit adalah Ly, yaitu Lyt pada sel-T dan Lyb pada sel-B. Antigen inilah yang digunakan untuk membedakan subpopulasi limfosit mencit.

MHC (*Major Histocompatibility Complex*) pada manusia, sedangkan pada mencit dinamakan komplek H-2, untuk MHC kelas I (lokus A, B, C) sama dengan H2K1 , H2D, H2L, untuk MHC kelas II (lokus DR, DP, DQ) sama dengan H2IA dan H2IE (Hudson, 1989; Kincade, 1989; Roitt, 1990).

Tabel 2.2 Ekuivalensi Fungsional Antara Antigen Permukaan Sel Manusia dan Mencit, yang Dideteksi dengan Antibodi monoklonal.

Ag manusia	Ag mencit	Distribusi	Fungsi
CD2	Ly-37	sel T & B	aktivasi sel T
CD4	L3T4	sel T	mengikat molekul MHC kelas II
CD5	Ly-1	Sel T dan subset sel B	
CD8a	Ly-2	T-sitotoksik	adhesi T-sitotoksik
CD8b	Ly-3	T-sitotoksik	adhesi T-sitotoksik
CD11a	Ly-15	sel T & B dan Sel NK	adhesi
CD11b	Ly-40	makrofag dan granulosit	reseptor C3bi
CD20	Ly-44	sel B	
CD23	Ly-42	sel B	reseptor Fc IgE
CD25	Ly-43	sel T & B	reseptor IL-2
CD32	Ly-17		reseptor 1/Fc IgG2b
CD45	Ly-5	pan-leukosit, thimosit	peran pada maturasi sel B

2.3.4 Respon imun

Respon imun merupakan reaksi tubuh yang kompleks, yang dibangkitkan oleh imunogen, mampu membedakan *self* (zat yang berasal dari tubuh sendiri) dan *nonself* (zat asing) (Goodman,

1991). Pada individu normal imunogen dalam tubuh akan menimbulkan respon imun.

Respon yang diberikan terhadap masuknya bahan-bahan asing dinamakan respon imun. Respon imun dikategorikan dalam 2 tipe :

a. **Respon imun natural** atau disebut juga *Innate*, respon imun *nonspesifik*,

Mekanisme melindungi tubuh terhadap mikroba atau makromolekul asing yang dilakukan oleh barrier fisik, sel-sel fagosit, eosinofil dalam darah dan jaringan, sel-sel NK (Natural Killer) dan berbagai molekul, dinamakan respon imun natural yang dapat berupa fagositosis oleh sel-sel makrofag, neutrofil, eosinofil dan monosit. Sel-sel fagosit untuk menuju antigen sasaran dibantu oleh komplemen yang mengeluarkan faktor luekotaktik dan kemotaktik, dan proses fagositosis memerlukan imunoglobulin sebagai opsonin. Respon imun natural lainnya adalah reaksi inflamasi akibat dilepaskannya mediator-mediator tertentu oleh beberapa jenis sel, seperti basofil yang melepas histamin dan trombosit yang melepas vasoaktifamin (Klein, 1990; Sigal, 1994; Abbas, 1994).

- b. **Respon imun adaptif** atau disebut juga *Acquired*, respon imun *spesifik* (Stites, 1991; Roitt, 1993; Abbas, 1993).

Merupakan suatu komponen yang terintegresi dari pertahanan tubuh di mana berbagai macam sel dan fungsi molekul bekerja secara kooperatif. Gambaran penting dari respon imun adaptif meliputi spesifitas, *memory* dan diskriminasi antara *self* dan *nonself* (Abbas, 1994). Dimulai dari aktivitas makrofag atau sel-sel yang tergolong APC (*antigen presenting cell*) lainnya dan sel-sel lain yang terinfeksi mikroba yang memproses antigen sedemikian rupa, sehingga dapat mempresentasikan melalui molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*) yang sesuai ke permukaan sel sehingga dapat dikenali oleh sel-sel imunokompeten yang lain. Interaksi antara kompleks antigen-MHC dengan reseptor dari sel-sel imunokompeten akan berakibat terjadinya rangsangan terhadap sel-sel imunokompeten tersebut sehingga akan berproliferasi, berdiferensiasi atau melepas sitokin yang kemudian akan mempengaruhi sel-sel imunokompeten yang lain lagi (Klein, 1990; Roitt, 1993; Sigal, 1994; Abbas, 1994; Kubly, 1994).

Berdasarkan jenis sel yang terlibat, respon imun dibagi menjadi :

a. **respon imun seluler ;**

berupa proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T, seperti : sel T-helper, sel T-sitotoksik dan sel T-supresor, dengan fungsi efekturnya masing-masing.

b. **respon imun humoral ;**

berupa proliferasi dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang akhirnya akan memproduksi antibodi. Antibodi akan mengikat antigen yang masuk untuk membentuk kompleks yang mengaktifkan komplemen, atau sebagai opsonin terhadap sel-sel fagosit, seperti sel neutrofil dan sel-K.

Interaksi antara respon imun seluler dan humoral

Aktivasi limfosit T oleh antigen akan mengakibatkan sel T berdiferensiasi menjadi sel T-helper dan sel T-sitotoksik / supresor. Selanjutnya sel T-helper akan berdiferensiasi menjadi sel T-helper 1 yang mensekresi IL-1 , IL-2, Interferon dan TNF, dan sel T-helper 2 yang mensekresi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Sekresi sel T-helper 1 akan merangsang sel makrofag (respon imun seluler), sedangkan sekresi sel T-helper 2 akan

merangsang sel B menjadi sel plasma yang membentuk antibodi (respon imun humoral) (Sigal, 1994).

2.3.5 Komponen Sel pada Respon imun

Semua sel yang berfungsi dalam respon imun diketahui berasal dari sel induk pluripoten yang kemudian berdiferensiasi menjadi dua kelompok besar yaitu, limfosit dan *antigen presenting cells* (APC) (Kuby, 1992). Pengelompokan sel yang lain adalah sebagai berikut sel limfoid, sel mononuklear fagositik, polimorfonuklear granulosit dan sel tubuh lain (Stites, 1991; Male, 1991; Roitt, 1993).

Limfosit diproduksi dalam organ limfoid primer (timus dan sumsum tulang belakang), dengan kecepatan 10^9 tiap hari. Beberapa dari sel limfosit bermigrasi melalui sirkulasi darah menuju jaringan limfoid sekunder (limpa, kelenjar getah bening, tonsil dan kelenjar limfoid mukosa). Limfosit yang beredar dalam sirkulasi darah kira-kira berjumlah 20 % dari jumlah seluruh lekosit dalam darah orang dewasa. Populasi limfosit dibedakan dua jenis, yaitu : limfosit B dan limfosit T (Kuby, 1992; Roitt, 1993).

Limfosit B berkembang dalam bursa fabricius yang timbul dari epitel kloaka pada unggas. Pada manusia belum didapatkan hal

yang analog dengan bursa tersebut, diperkirakan pendewasaan limfosit B terjadi di dalam sumsum tulang, kemudian meninggalkan tempat tersebut masuk ke peredaran darah dengan menyangang reseptor antibodi membran. Apabila sel tersebut bertemu dengan imunogen yang spesifik, maka sel tersebut akan mengalami proliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma (*effector cells*) dan limfosit B *memory*. Sel plasma tidak menyangang reseptor antibodi membran, tetapi dapat mensekresi antibodi (Imunoglobulin). Sel plasma hanya hidup beberapa hari, tetapi satu sel plasma pada fase respon sekunder dapat memproduksi antibodi 100 - 1000 kali lebih tinggi (2000 molekul antibodi per detik). Sebagai respon imun humoral (Male, 1991; Kuby, 1992; Roitt, 1992).

Limfosit T dibuat di jaringan hemopoisis pada sumsum tulang, tetapi setelah meninggalkan tempat tersebut, limfosit T akan mengalami maturasi di kelenjar timus. Berbagai macam sub-tipe limfosit T mempunyai alur fungsi pengendalian dan efektor serta limfosit *memory*. Selama proses maturasi di kelenjar timus, Limfosit T dapat mengekspresikan reseptor untuk antigen yang dikenal dengan molekul *major histocompatibility complex* atau MHC (Male, 1991; Kuby, 1992; Roitt, 1992).

Sel fagosit adalah kelompok sel-sel yang berfungsi melakukan fagositosis terhadap benda asing yang menginvasi tubuh. Secara umum sel fagosit dibagi dalam 2 grup, yaitu sel fagosit mononuklear dan granulosit. Sel fagosit mononuklear yang terdapat di dalam sirkulasi darah disebut monosit, sedangkan yang terdapat di dalam jaringan atau organ disebut makrofag. Sesuai dengan tempatnya, sel makrofag dalam hati dinamakan sel Kuffer, dalam paru dinamakan makrofag alveolar dan dalam sistem saraf pusat dinamakan mikroglia. Dahulu sel-sel fagosit mononuklear ini dikelompokkan dalam suatu sistem yang dikenal dengan nama RES (*reticuloendothelial system*), tetapi sekarang dikelompokkan dalam sistem fagosit mononuklear (Kuby, 1992; Abbas, 1994).

Granulosit polimorfonuklear (PMN) dikenal juga sebagai sel-sel inflamasi, karena memegang peranan penting dalam proses inflamasi. Fungsi utama dari sel granulosit adalah memfagosit mikroba atau makromolekul asing yang masuk tubuh, berperan dalam sistem imun natural. Granulosit polimorfonuklear 60 - 70 % berada dalam sirkulasi darah, tetapi juga didapatkan yang mengalami ekstravasasi. Berdasarkan reaksi pengecatan granula dalam sitoplasma, maka dapat dibedakan menjadi tiga macam sel, yaitu neutrofil, basofil dan eosinofil (Roitt, 1992; Abbas, 1994).

Neutrofil merupakan populasi terbesar dari sel-sel di dalam respon inflamasi akut. Neutrofil akan mengeluarkan bahan-bahan dari granula sitoplasma. Beberapa bahan tersebut adalah mediator kimia (faktor kemotaksis, fibrinolitik, sistem kinin) dan bahan sitotoksik (asam hidrolase, mieloperoksidase, muramidase dan lactoferin). Hampir 90 % dari granulosit dalam sirkulasi terdiri dari sel neutrofil.

Neutrofil memiliki reseptor terhadap antibodi kelas IgG dan reseptor terhadap protein komplemen dan akan bermigrasi dan terkumpul di tempat-tempat di mana terjadi aktivasi komplemen, oleh karena itu neutrofil berperan juga sebagai sel efektor dalam imunitas humoral (Male, 1991; Roitt, 1993; Abbas, 1994).

Eosinofil berjumlah kira-kira 2 - 5 % dari seluruh jumlah lekosit (pada orang dewasa yang tidak mengidap penyakit alergi) dalam sirkulasi. Sel tersebut mampu untuk mengadakan fagositosis (Roitt, 1993). Eosinofil memiliki reseptor terhadap antibodi kelas IgE sehingga dapat berikatan dengan partikel yang disalut (*coating*) oleh IgE (Abbas 1994).

Basofil dan sel Mast. Basofil ditemukan dalam darah kira-kira berjumlah kurang dari 0,2 % lekosit. Sebaliknya sel Mast tidak dapat ditemukan dalam darah, tetapi hanya ada pada jaringan. Basofil maupun sel Mast mengekspresi dengan afinitas yang tinggi, reseptor untuk IgE, oleh karena itu dapat berikatan dengan IgE bebas. Ikatan antigen dengan IgE di permukaan basofil akan merangsang basofil dan sel Mast untuk melepas isi granulnya yang merupakan mediator dari reaksi hipersensitivitas (Stites, 1991; Roitt, 1993; Abbas, 1994).

Sel NK (*Natural Killer*) berjumlah 0.6 - 2.4 % dari limfosit dalam darah. Aktivitas sel NK dapat diekspresikan oleh neutrofil, makrofag dan beberapa jenis limfosit T. Sel NK berasal dari sumsum tulang dan terlihat sebagai sel limfosit yang besar dengan granul-granul di dalam sitoplasmanya, oleh karena itu disebut Large Granular Lymphocyte (LGL). Sel NK memiliki kemampuan untuk membunuh sel tumor dan sel yang terinfeksi virus. Proses pembunuhannya tidak spesifik terhadap determinan antigen tertentu dan tidak memerlukan bantuan molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*) untuk mempresentasikan antigen. Jadi sifat pembunuhannya adalah natural atau alamiah dan tidak diinduksi antigen tertentu. Sel NK digolongkan dalam sistem imun seluler

natural. Sel NK merupakan komponen utama *immune surveillance* (Wagner, 1991; Kuby, 1992; Roitt, 1993).

Monosit berjumlah kira-kira 5 % dari lekosit total. Setelah diproduksi di sumsum tulang, monosit masuk ke dalam aliran darah. Sel tersebut akan tinggal di jaringan tubuh lain menjadi makrofag, yaitu sel dendritik di kelenjar getah bening, sel glia di otak, sel Kulffer di hati, sel Langerhans di kulit (Male, 1991; Playfair, 1992).

2.3.6 Sitokin

Sitokin adalah suatu protein yang disekresi oleh sel-sel dari sistem imun . Sitokin merupakan semua mediator kimia yang dihasilkan oleh sel komponen pertahanan tubuh, kecuali yang dihasilkan organ kelenjar khusus (hormon). Sitokin dapat berfungsi sebagai sistem pengendalian antar sel pertahanan tubuh (Clemens, 1991; Tizard, 1995).

Beberapa contoh sitokin (Interleukin = IL), asal sekresi, target dan mekanisme aktivasi terdapat pada tabel 2.3 (Male, 1991; Kuby, 1992).

Tabel 2.3 Beberapa Tempat Produksi, Target dan Efek Interleukin (Male, 1991;65)

Cytokine	Source	Target	Principal
IL-1 α	macrophage	lymphocytes macrophages	lymphocyte costimulation
	fibroblast		activation of phagocytes
IL-1 β	lymphocytes	other	prostaglandin production
	epithelial cells		numerous effects
IL-2	astrocytes	T cells I.G.Ls (B cells)	T cell growth & activation
	T-cells		
IL-3	T cells	stem cells	promotes
	mast cells		haemopoietic cell production
IL-4	T cells	B cells	early activation
	bone marrow stroma		
IL-5	T cells	T cells	division &
	macrophages	B cells (mouse)	differentiation
IL-6	macrophages	B cells	B cells differentiation
	fibroblasts	T cells	acute phase
	T cells	hepatocytes	protein induction
IL-7	bone marrow	lymphocytes	division
	stroma		
IL-8	fibroblasts	monocytes	chemotaxis
	monocytes	T cells	
	endothelium	neutrophils	
IL-9	T cells	T cells	division
IL-10	T cells	lymphocytes	?

2.3.7 Respon imun terhadap imunogen

Salah satu cara mengetahui adanya respon imun adalah dengan cara pemberian imunogen. Tetapi respon tersebut dapat berupa respon seluler maupun respon humoral (Stites, 1991; Roitt, 1993). Pemaparan imunogen terhadap sel B menyebabkan proliferasi dan diferensiasi sel menjadi sel plasma yang menghasilkan imunoglobulin dan sel *memory*. Sel *memory* yang terpapar imunogen yang pernah dikenal akan memberikan respon imun dalam waktu cepat. Pemaparan imunogen dapat merangsang aktivitas Th, maka Th akan menghasilkan limfokin yang akan memodulasi baik mekanisme alur sel B maupun subtipe sel T lainnya. Sel T *memory* juga akan terangsang lebih cepat apabila terjadi pemaparan ulang (Kuby, 1992; Roitt, 1993).

Sifat respon imun adalah spesifik, amplifikatif dan mempunyai *memory*. Seluruh mekanisme spesifik tersebut dilakukan oleh limfosit T, limfosit B, limfokin dan sitokin. Tujuan dari respon imun adalah untuk mempertahankan homeostasis yang tidak hanya pada sistem pertahanan tubuh sendiri, tetapi juga kondisi homeostasis seluruh tubuh (Virus, 1985; Vander, 1990; Chandrasoma, 1991; Clemens, 1991; Goodman, 1991; Roitt, 1993).

Imunogen yang dipaparkan akan ditangkap oleh *antigen presenting cells (APCs)*. APCs yang dapat mengekspresikan MHC kelas II akibat pemaparan imunogen menyebabkan respon limfosit T sitotoksik untuk menghancurkan sel target. APCs yang dapat mengekspresikan MHC kelas II akan mengaktifasi Th melalui *T Cell receptor (TCR)* dan IL-1. Aktivasi Th tersebut menimbulkan sekresi sitokin, proliferasi dan diferensiasi yang membuahkan *Th-memory*. Sekresi sitokin akan menyebabkan aktivasi limfosit B dan limfosit T sitotoksik. Hasil akhir aktivasi limfosit B adalah produksi imunoglobulin dan limfosit B-*memory*. Sebaliknya aktivasi limfosit T sitotoksik akan merusak sel target akan membentuk limfosit T-sitotoksik-*memory* (Kuby, 1992; Stites, 1994).

Adanya pengaruh sistem saraf pusat terhadap sistem pertahanan tubuh telah membuka wawasan dalam sistem pertahanan tubuh yang bersifat otonomik. Fenomena tersebut terbukti dengan adanya reseptor beberapa neurotransmitter, neuropeptid dan hormon pada limfosit. Secara invitro telah terbukti, bahwa katekolamin, endorpin, enkepalin, ACTH, kortisol, substansi P (SP), *vasoactive intestinal peptide (VIP)*, hormon pertumbuhan (GH), tiroksin dapat mempengaruhi aktivitas proliferasi dan diferensiasi limfosit dan sel NK (Fraser, 1981; Ottaway, 1984; Plotnikoff, 1985;

Goetzl, 1987; McGills, 1987; O'dorisio, 1987; Stites, 1987; Roitt, 1993; Sigal, 1994). Dengan demikian respon imun tidak hanya dikendalikan secara otonomik, tetapi juga diperankan oleh aktivitas sistem saraf pusat yang sangat peka terhadap pengaruh perubahan dari dalam tubuh (*internal*) atau pengaruh dari luar (*eksternal*) (Stites, 1987; Playfair, 1992).

2.3.7 Imunomodulator

Imunomodulator dapat berupa bahan - bahan biologik endogen atau bahan alam eksogen yang berasal dari bahan sintetik atau dari bahan alam seperti : hewan, tanaman, mikroorganisme yang dapat mempengaruhi sistem imun natural maupun adaptif dan sistem imun humoral maupun seluler dengan manifestasi berupa stimulasi atau supresi terhadap komponen sistem imun. Dengan semakin banyak diketahui tentang mekanisme sistem imun sampai pada tingkat molekuler, pendekatan imunomodulasi yaitu suatu cara untuk mengembalikan atau memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan sistem imun yang fungsinya berlebihan semakin lebih terarah, lebih spesifik dan lebih berdaya guna. Mekanisme imunomodulasi ditujukan terhadap hampir semua sel-sel imunokompeten (Jaffe, 1991; Zhang, 1991).

Berdasarkan mekanisme kerja imunomodulator dibagi menjadi :

- a. imunostimulator, adalah bahan-bahan yang dapat meningkatkan aktivitas dan fungsi sistem imun,
- b. imunorestorator adalah bahan - bahan yang dapat mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu, dengan cara memberikan berbagai komponen dari sistem imun,
- c. Imunosupresor, adalah bahan-bahan yang dapat menekan aktivitas dan fungsi sistem imun normal atau sistem imun yang terganggu.

Modulator respon imun adaptif dan natural, dalam hal - hal tertentu dapat dicapai dengan menggunakan bermacam - macam bahan fisik maupun bahan kimia yang dapat mengubah kualitas respon imun,. Pemberian bahan imunomodulator dapat memberikan efek positif terhadap respon imun (imunopotensiasi / imunostimulasi) atau dapat memberikan efek negatif terhadap respon imun (imunosupresi). Imunosupresi dapat terjadi secara akut atau kronis, dengan menggunakan baik agen fisik atau bahan kimia (Hokama, 1982).

Stres dapat dikategorikan sebagai modulator respon imun. Peningkatan sekresi berbagai hormon seperti : ACTH dan kortisol

pada keadaan stres menimbulkan imunomodulasi. Mekanisme imunomodulasi tersebut disebabkan oleh peningkatan sekresi berbagai hormon dalam keadaan stres yang dapat menekan respon imun (Ader, 1991; Serrano, 1993; Sigal, 1994). Dengan demikian hasil akhir rangsangan dari stres menimbulkan penekanan respon imun atau imunosupresif.

Bab 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

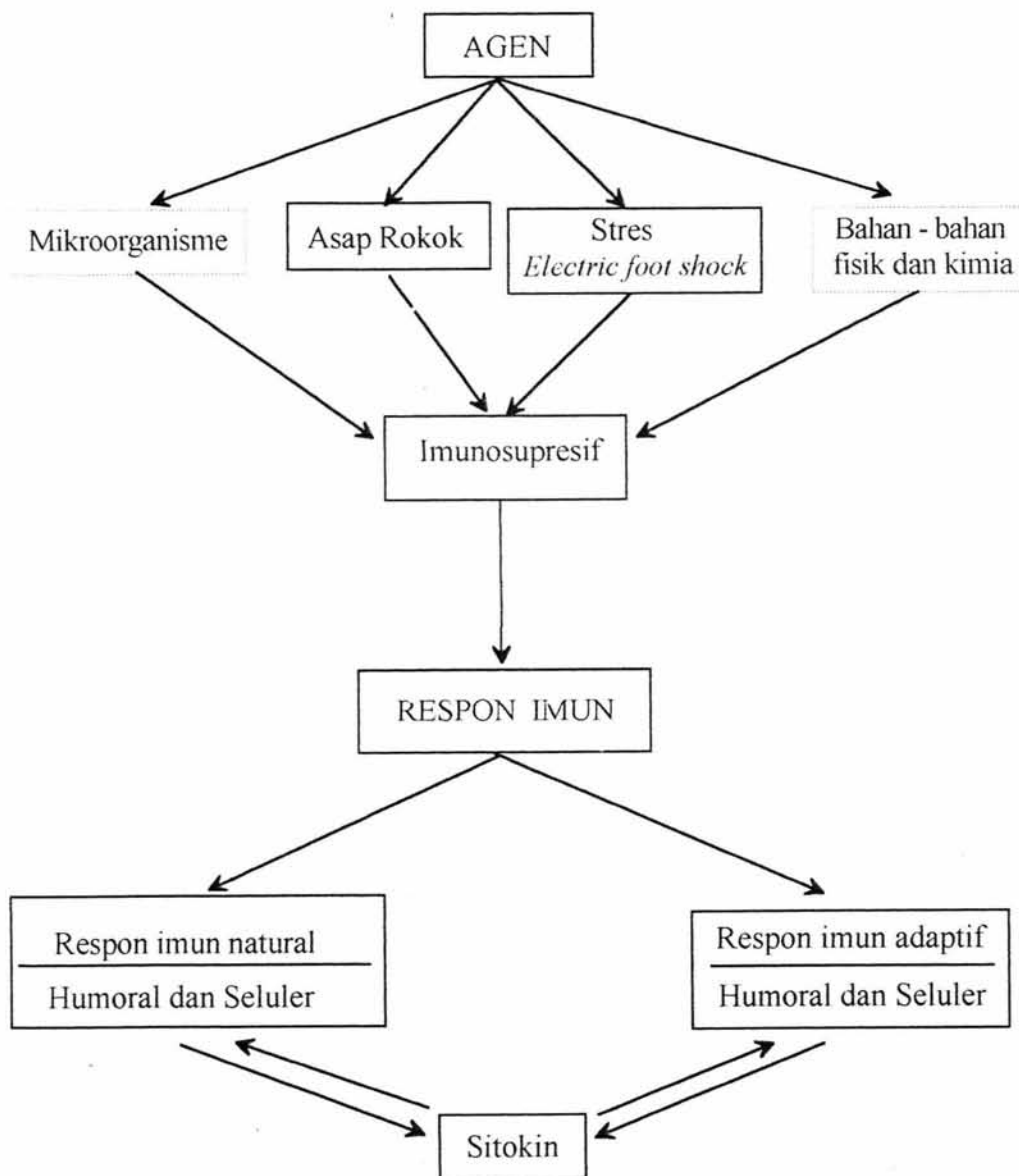
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Pada penelitian ini konsep yang dipakai meliputi.

1. Asap rokok merupakan stresor yang dapat menyebabkan aktivasi neurohumoral yang mengakibatkan pelepasan hormon stres antara lain ACTH dan kortisol. Peningkatan kortisol dalam darah akan menekan respon imun.
2. Stres dari *electric foot shock* merupakan bentuk stres fisik yang dapat bertindak sebagai immunosupresor. Mekanisme immunosupresi tersebut disebabkan oleh meningkatnya kadar hormon kortisol dalam darah selama pemberian stresor.
3. Asap rokok dan stres dari *electric foot shock* mempunyai aktivitas sebagai immunosupresor. Keduanya meningkatkan kortisol dalam darah yang dapat menekan respon imun.

Konsep pengaruh bersama asap rokok dan stres terhadap respon imun menyebabkan kumulatif penekanan fungsi imun baik humoral maupun seluler.

Kerangka Konseptual



3.2 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang masalah, tinjauan kepustakaan, kerangka konseptual serta tujuan penelitian yang ingin dicapai, maka dirumuskan hipotesis sebagai berikut.

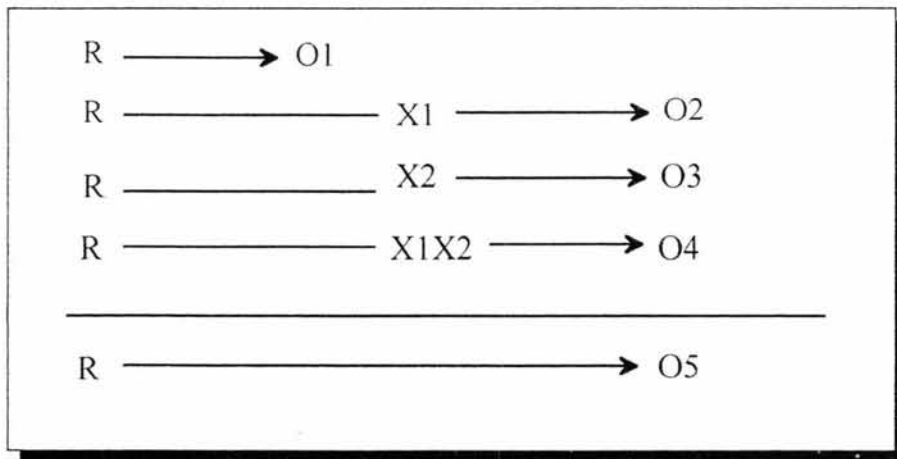
1. Asap rokok kretek menurunkan respon imun.
2. Stres fisik dari *electric foot shock* menurunkan respon imun
3. Gabungan stresor asap rokok dan stres *electric foot shock* secara kumulatif lebih menurunkan respon imun.

Bab 4

METODA PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dikerjakan dengan rancang bangun penelitian eksperimental menggunakan modifikasi *The Separate Sample Pretest-Posttest Control Group Design*.



Keterangan :

R = Random

O = Observasi pengukuran respon imun

X_1 = Perlakuan Kelompok I asap rokok

X_2 = Perlakuan Kelompok II stres *electric foot shock*

X_1X_2 = Perlakuan Kelompok III gabungan I dan II

- O_1 = pengukuran variabel kelompok kontrol 1 (tanpa perlakuan)
- O_2 = pengukuran variabel kelompok I
- O_3 = pengukuran variabel kelompok II
- O_4 = pengukuran variabel kelompok III
- O_5 = pengukuran variabel kelompok kontrol 2 (tanpa perlakuan)

4.2 Sampel penelitian

Digunakan mencit putih galur BALB/C dewasa jenis kelamin jantan umur antara 2 - 4 bulan dengan alasan secara seksual mencit telah dewasa (*sexually mature*) dan perubahan berat badan selama proses penelitian relatif kecil.

4.3 Tempat penelitian

Pengujian imunologis dikerjakan di Laboratorium Litbang, bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, dan di Makmal Endokrin, Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya

4.4 Besarnya sampel

Prakiraan besar sampel dihitung dengan rumus Daniel (1987).

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{1-\beta})^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

$$Z_{\alpha} = 1.96 \quad \alpha = 0.05$$

$$Z_{1-\beta} = 0.842 \quad 1-\beta = 0.80$$

$$\sigma = 0.05$$

$$d = 0.05$$

$$n = \frac{(1.96 + 0.842)^2 \times (0.05)^2}{(0.05)^2}$$

$$n = 7.85 = 8$$

Atas dasar perhitungan dengan menggunakan rumus Daniel besar sampel (n) yang didapatkan sebesar 8. Dalam penelitian ini digunakan 9 ekor mencit jantan untuk setiap kelompok.

4.5 Identifikasi dan Pengukuran Variabel

4.5.1 Variabel tergantung

Variabel tergantung respon imun mencit, berupa respon imun adaptif dan natural, seluler dan humoral yang ditetapkan sebagai berikut.

- a. Sel fagosit Neutrofil
- b. Komplemen
- c. Proliferasi Limfosit T
- d. Proliferasi Limfosit B
- e. IL - 2
- f. IL - 4
- g. IFN - γ

- h. TNF - α
- i. Kortisol

4.5.2 Variabel bebas

- a. Pemberian asap rokok (kretek)
- b. Pemberian stres artifisial (*Electric Foot Shock*).
- c. Pemberian gabungan asap rokok dan stres artifisial.

4.5.3 Variabel Kendali

- a. Mencit jantan BALB/C
- b. Kandang mencit
- c. Pakan pelet
- d. Minuman aqua
- e. Pemeliharaan
- f. Dosis asap rokok
- g. Dosis stres artifisial (*Electric Foot Shock*)

4.6. Definisi operasional

1. Stresor dari asap rokok dan *electric foot shock* dapat menurunkan respon imun mencit, melalui aktivasi neurohumoral yang mengakibatkan pelepasan hormon ACTH dan kortisol.
2. Penurunan respon imun secara komprehensif yaitu meliputi penurunan respon imun baik yang natural maupun respon-imun adaptif, humoral dan seluler.

3. Asap rokok ialah asap rokok dari rokok yang diisap dengan alat "Wright" kemudian dialirkan di depan lubang hidung mencit. Pemaparan asap rokok kretek dilakukan selama 20 detik dengan interval 1 menit diulang sebanyak 5 kali. Rata-rata waktu pemaparan dalam alat pengasap antara 5-6 menit. Setelah pemaparan diberikan udara segar. Setiap hari diberikan asap rokok di mana frekuensi pemaparan meningkat selama 7 hari.
4. Stres artifisial adalah stres yang ditimbulkan dengan alat electric yang mempunyai besar arus 0 - 3 mA, rata-rata pemberian arus listrik sebesar 0.8 mA yang diberikan pada mencit. Jumlah pemberian shock diberikan dalam frekuensi yang meningkat antara 4 hingga 18 *shock* dengan interval 4 menit dalam 2 - 5 *session* sehari selama 7 hari. Pemberian stres yang berulang dengan disertai peningkatan dosis.

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan mencit galur BALB/C yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Digunakan mencit jantan karena tidak mempunyai siklus estrus, sehingga perubahan yang terjadi benar-benar disebabkan oleh perlakuan.

4.7.2 Kandang Hewan Percobaan

Kandang mencit yang digunakan terbuat dari bak plastik yang ditutup dengan anyaman kawat, beralaskan sekam. Sebelum kandang digunakan dicuci bersih, dan kandang plastik disterilkan dengan alkohol 70 %, sedangkan sekam untuk alas dioven pada suhu 160° C selama 2 jam dan disimpan dalam wadah yang rapat sebelum digunakan.

4.7.3 Alat stresor Asap Rokok

Pemaparan asap rokok dilakukan dengan alat Wright konstruksi Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Alat tersebut terdiri dari motor sebagai penggerak pengisap rokok, pengisap rokok, saluran pengisap dan penyalur asap rokok.

4.7.4 Alat Stresor *Electric Foot Shock*

Perlakuan stres artifisial pada mencit dengan mengalirkan arus listrik melalui kawat - kawat tembaga di dasar bagian bawah kandang percobaan. Alat ini mempunyai penunjuk untuk mengetahui besarnya arus listrik yang diberikan pada mencit. Alat stresor mencit ini dibuat oleh Laboratorium Elektronika Arus Lemah Teknik Elektro Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya (ITS).

4.7.5 Kandang Percobaan

Perlakuan stres elektrik dan asap rokok dilakukan di kandang percobaan yang berukuran 30 x 22.5 x 15 cm. Kandang percobaan ada 3 buah.

a. Kandang percobaan stres asap rokok.

Kandang percobaan ini terbuat dari aluminium sebagai rangka dan kaca sebagai dinding dan bagian atasnya serta penutup di bagian bawah yang tertutup rapat sehingga asap rokok tetap berada dalam kandang percobaan.

b. Kandang percobaan stres *electric foot shock*

Kandang percobaan ini juga terbuat dari aluminium untuk kerangkanya dan kaca untuk dinding dan tutup bagian atasnya, dan di dasar bagian bawah kandang ini diberi kawat tembaga untuk mengalirkan arus listrik.

c. Kandang percobaan gabungan

Kandang percobaan ini terbuat dari aluminium untuk kerangkanya dan dindingnya kaca, landasan diberi kawat tembaga untuk mengalirkan arus listrik dan kandang tertutup rapat-rapat sehingga asap rokok yang dihembuskan tetap berada dalam kandang.

4.7.6 Rokok Kretek

Rokok kretek adalah rokok khas Indonesia di mana bahan utamanya terdiri dari tembakau dan cengkeh.

4.7.7 Pakan Hewan Percobaan

Suplementasi makanan digunakan pelet standar untuk mencukupi kebutuhan energi, lemak, protein, vitamin dan mineral. Pakan berupa pelet butiran BR 1 CP 511 yang telah disterilkan lebih dulu buatan PT. CHAROEN POKHPAND INDONESIA, Mojokerto, Jawa Timur. Minuman yang diberikan untuk mencit adalah aqua.

4.8 Tata Laksana Penelitian

Mencit diambil secara random dari kandang hewan percobaan yang berasal dari populasi BALB/C, dengan berat badan antara 30 - 35 gram dan jenis kelamin jantan. Mencit terpilih ditempatkan dalam satu kurungan masing-masing 9 ekor. Dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yaitu : 2 kelompok Kontrol (terdiri dari kelompok Kontrol 1 dan kelompok Kontrol 2) serta 3 kelompok Perlakuan. Sebelum digunakan untuk pengujian, mencit tersebut selama 1 minggu diadaptasikan untuk hidup bersama dalam 1 kurungan. Kalau ada mencit yang bersifat agresif, segera diganti dengan yang baru, sampai didapatkan mencit yang hidup rukun dalam satu kurungan.

Pada kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok yaitu :

1. Kelompok Perlakuan 1 diberi perlakuan pemaparan asap rokok kretek pada penelitian ini digunakan rokok kretek yang mempunyai kandungan nikotin sekitar 5,29 mg per batang. Pemaparan asap rokok kretek dengan cara proses pengisapan

asap rokok menggunakan alat "Wright" konstruksi Laboratorium Farmakologi FK UNIBRAW, yang memungkinkan asap rokok aliran utama (AAU) mengalir langsung ke dalam kandang percobaan mencit. Pemaparan dilakukan selama 20 detik dengan interval 1 menit dan diulang sebanyak 5 kali kemudian diberi udara segar. Rata-rata waktu pemaparan dalam kandang 5 - 6 menit. Hari pertama dan kedua dalam 2 *session*, hari ketiga dan keempat 3 *session*, hari kelima dan keenam 4 *session* dan hari ketujuh 5 *session*.

2. Kelompok Perlakuan 2 diberikan stres fisik berupa *electric foot shock* dengan cara mengalirkan arus listrik pada kawat-kawat tembaga di dasar bagian bawah kandang percobaan yang digunakan oleh mencit untuk menginjakkan kakinya. Dengan dialirkan arus listrik maka dapat diberikan kejutan (*shock*) pada mencit bila terkena arus listrik. Pemberian arus listrik pada mencit sebesar 0 - 1 mA. Pada setiap perlakuan rata-rata pemberian arus listrik sebesar 0.8 mA. Jumlah pemberian *shock electric* yaitu : Hari pertama 4 *shock* dalam 2 *session*, hari kedua 8 *shock* dalam 2 *session*, hari ketiga 10 *shock* dalam 3 *session*, hari keempat 12 *shock* dalam 3 *session*, hari kelima 14 *shock* dalam 4 *session*, hari keenam 16 *shock* dalam 4 *session*

dan hari ketujuh 18 *shock* dalam 5 *session* dengan interval 4 menit untuk tiap *session*.

3. Kelompok Perlakuan 3 diberikan perlakuan gabungan berupa pemberian asap rokok dengan cara seperti kelompok perlakuan 1 dan diberi perlakuan stres fisik *electric foot shock* seperti kelompok Perlakuan 2 secara bersamaan. Setelah perlakuan pada hari ketujuh pengambilan darah dilakukan melalui intrakardial sekurang-kurangnya satu jam setelah perlakuan. Kemudian sampel darah diproses untuk pemeriksaan sistem imun humoral, sistem imun seluler dan kadar hormon kortisol dalam serum.

4.9 Pengukuran variabel tergantung

4.9.1 Uji Fagositosis sel granulosit dengan tes NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

Prinsip Pengujian.

Dalam keadaan normal granulosit yang mengalami proses fagositosis, akan mereduksi NBT menjadi formasan. Endapan formasan akan nampak sebagai bercak hitam dalam sitoplasma granulosit. Endapan ini dapat dilihat pada sediaan hapus yang diwarnai dengan pewarnaan Wright.

Komponen sistem imun yang diuji : sel Granulosit Neutrofil

Respon imun yang diuji : respon imun natural

Alat-alat yang digunakan :

- a. penangas air untuk 37° C
- b. pipet semiotomatik 0.050, 0.100, 0.500 ml
- c. pipet volumetrik 1 ml, 1.5 ml
- d. tabung kaca ukuran 0.7 x 5 cm
- e. tabung plastik 1 x 5 ml
- f. kaca obyek
- g. mikroskop cahaya

Reagen yang digunakan.

- a. Reagen kit dari Sigma cat.no 840-10 berisi NBT
- b. Reagen kit dari Sigma cat.no 840-10 berisi Stimulan

Cara kerja.

- a. Ke dalam tabung plastik yang telah diberi 0.050 ml Stimulan, dituangkan 0.500 ml darah heparin.
- b. Tabung ditutup dengan parafilm, tabung digoyangkan perlahan.
- c. Tabung dibiarkan dalam suhu kamar selama 15 menit.
- d. Sebanyak 0.100 ml darah bercampur Stimulan dimasukkan ke dalam tabung kaca yang telah diberi 0.100 ml reagen NBT, ditutup dengan parafilm.
- e. Dieram dalam penangas air dengan suhu 37° C selama 15 menit.

- f. Tabung diambil dan dibiarkan dalam suhu ruangan selama 10 menit.
- g. Kemudian dalam darah itu, dibuat sedian hapus dan diwarnai dengan pulasan Wright.

Kriteria hasil.

Jumlah granulosit yang mengandung endapan hitam dalam sitoplasmanya, dinyatakan dengan persen dari seratus granulosit.

4.9.2 Pengujian Hemolitik total Komplemen

Prinsip pengujian.

Mengukur kemampuan hemolitik komplemen terhadap indikator hemolitik yang terdiri dari sel darah merah domba dan hemolisin.

Komponen sistem imun yang diuji : komplemen

Respon imun yang diuji : respon imun humoral natural

Alat-alat yang digunakan :

- a. tabung
- b. pipet pasteur
- c. sentrifugasi
- d. spektrofotometer

Reagensia yang digunakan :

bufer barbiton, sel darah merah domba, hemolisin, larutan amonia
0.04 %

Cara kerja.

- a. Standarisasi eritrosit
- b. 15 ml suspensi sel darah merah domba 25 % ditambah larutan amonia sampai lisis, kemudian buat suspensi 6 % dan ditentukan ODnya pada 541 nm
- c. Dibuat pengenceran dari serum mencit yang akan diperiksa dengan larutan bufer, dan tambahkan ke dalamnya masing-masing 0.3 ml indikator hemolitik
- d. Inkubasikan selama 1 jam pada suhu 37⁰ C
- e. Tambahkan ke dalam masing-masing tabung 2 ml bufer dan dinginkan dalam air es, kemudian disentrifus.
- f. Baca OD pada 541 nm

Kriteria Hasil.

Hemolitik total yang diukur adalah hemolitik 50 % (CH₅₀) yang diamati berdasarkan OD dari indikator hemolitik. .

4.9.3 Uji proliferasi Limfosit T dan Limfosit B

Prinsip pengujian.

Mengukur kemampuan proliferasi sel - T setelah dirangsang dengan mitogen Concanavalin A (Con A), dan kemampuan proliferasi sel-B setelah dirangsang dengan mitogen Lipopolisakarida(LPS), dengan cara mengukur cpm isotop ^3H - Thymidine yang dilabelkan

Komponen sistem imun yang diuji : Limfosit T dan Limfosit B

Respon imun yang diuji : respon imun seluler adaptif dan respon imun humoral adaptif

Alat-alat yang digunakan.

- a. Tabung Eppendorf
- b. Mikropipet
- c. Sentrifugasi
- d. Pipet pasteur
- e. Laminar flow
- f. CO_2 incubator
- g. Haemocytometer
- h. Microscope
- i. Costeur plate
- j. Cell Harvester
- k. Scintillation

I. β Counter

Reagensia yang digunakan.

- a. Mitogen Concanavalin A (Con A)
- b. Mitogen Lipopolisakarida (LPS)
- c. Ficol Hypaque
- d. RPMI 1640
- e. Fetal Bovin Serum
- f. ^3H Thymidine

Cara kerja.

- a. Sel Limfosit diisolasi dari darah perifer dengan *Ficol Hypaque* menggunakan metoda sentrifugasi.
- b. Sel Limfosit yang didapat diresuspensi dalam medium tumbuh sehingga konsentrasinya 1×10^6 sel/ml
- c. Suspensi sel limfosit sebesar 100 μl dimasukkan ke dalam sumur pada *microplate*, tambahkan Concanavalin A 10 mg/ml untuk proliferasi limfosit T dan Lipopolisakarida 10 mg/ml untuk proliferasi Limfosit B.
- d. Inkubasikan selama 3 hari dalam inkubator CO_2 5 % pada 37°C
- e. Tambahkan ^3H Thymidine 0.5 mci dalam larutan RPMI, 18 jam sebelum inkubasi selesai

- f. Kemudian panen sel pada kertas filter (*Whatman Filter*) dengan Harvester. Keringkan kertas filter pada suhu kamar selama sehari.
- g. Masukkan kertas filter dalam tabung penghitung
- h. Tambahkan Scintillation liquid
- i. Baca cpm dengan menggunakan β Counter

4.9.4 Pengujian terhadap IL-2

Prinsip Pengujian.

Mengukur fungsi sel T helper 1 (TH_1) dengan cara mengukur kadar IL-2 yang disekresi menggunakan metoda ELISA.

Komponen sistem imun yang diuji : limfosit T Helper 1

Respon imun yang diuji : respon imun seluler adaptif

Cara Kerja.

Kit ELISA yang digunakan *Mouse IL-2 Cytoscreen Immunoassay kit* dengan nomor katalog KMC 0022, nomor lot 091495 dengan metoda *double antibody sandwich* ELISA dengan marka streptavidin-biotin berlabel HRP.

- a. Lempengan mikrotiter dari polistiren yang dilapisi dengan antibodi spesifik terhadap IL-2 mencit, ke dalam tiap-tiap sumuran dimasukkan 50 μ l supernatan dari limfosit yang dirangsang dengan Concanavalin A (Con A) dan 100 μ l larutan dapar pengencer, 50 μ l

- pengenceran dari larutan standar IL-2, kemudian ditambah 50 μ l Antibodi II yaitu antibodi poliklonal anti IL-2 yang berasal dari kelinci berlabel biotin.
- b. Inkubasikan selama 2 jam pada 37⁰ C, dicuci 3 kali dengan larutan dapar pencuci, kemudian tambahkan 100 μ l larutan Conjugate Streptavidin-HRP, dan diinkubasi selama 60 menit pada 37⁰ C.
 - c. Dicuci 4 kali dengan dapar pencuci, kemudian ditambahkan 100 μ l substrat berupa larutan kromogen TMB (Tetrametil Benzidin), diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰ C di tempat gelap, larutan akan berwarna biru.
 - d. Ditambahkan 100 μ l *stopping solution*, warna yang terbentuk ditentukan absorpsinya dengan menggunakan Elisa Reader pada Lambda 450 nanometer.

4.9.5 Pengujian terhadap Interferon-gamma (IFN γ)

Prinsip pengujian.

Mengukur fungsi sel T helper -1 dengan cara mengukur kadar IFN γ yang disekresi dengan metoda ELISA.

Komponen sistem imun yang diuji : sel T helper 1

Respon imun yang diuji : respon imun seluler adaptif

Cara kerja.

Kit ELISA yang digunakan *Mouse IFN γ Cytoscreen Immunoassay kit* dengan nomor katalog KMC 4022, nomor lot 011502.

- a. Lempengan mikrotiter dari polistiren yang dilapisi dengan antibodi spesifik terhadap IFN γ , ke dalam tiap-tiap sumuran ditambahkan 100 μ l larutan dapar pengencer sebagai kontrol, kemudian 100 μ l supernatan dari limfosit yang dirangsang dengan Concanavalin A (Con A), 100 μ l pengenceran dari larutan standar IFN γ diinkubasi selama 2 jam pada 37^o C.
- b. Dengan dapar pencuci, dicuci 3 kali kemudian ditambahkan Antibodi II yaitu anti-IFN γ yang dilabel dengan biotin, diinkubasi selama 40 menit
- c. Sebelum ditambahkan dengan larutan Conjugate streptovidin - HRP sebanyak 100 μ l dicuci terlebih dahulu sebanyak 4 kali dengan larutan dapar pencuci, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada 37^o C.
- d. Ditambahkan 100 μ l substrat berupa larutan kromogen TMB, diinkubasi selama 30 menit pada 37^o C larutan akan berwarna biru.
- e. Ditambahkan *stopping solutin*, warna larutan berubah menjadi kuning oranye.
- f. Dengan menggunakan Elisa reader, dibaca pada Lambda 450 nanometer.

4.9.6 Pengujian terhadap TNF α (Tumor Nicrosis Factor Alpha)

Prinsip pengujian.

Mengukur fungsi monosit atau makrofag dengan cara mengukur kadar TNF α yang disekresi dengan metoda Elisa.

Komponen sistem imun yang diuji : sel T Helper 1

Respon imun yang diuji : respon imun seluler adaptif

Cara kerja.

Kit Elisa yang digunakan *Mouse TNF α Cytoscreen Immunoassay Kit* nomor katalog KMC 3012, nomor lot H021203

- a. Lempengan mikrotiter dari polistiren yang dilapisi dengan antibodi spesifik terhadap TNF α dipersiapkan, ke dalam tiap-tiap sumuran dimasukkan 100 μ l larutan dapar pengencer sebagai kontrol, kemudian 50 μ l supernatan dari limfosit yang dirangsang dengan Lipopolisakarida (LPS), atau 50 μ l pengenceran dari larutan standar TNF α , tambahkan 50 μ l antibodi anti-TNF α yang berlabel biotin ke dalam sumur-sumuran inkubasikan selama 1.5 jam pada suhu kamar.
- b. Dengan larutan dapar pencuci, dicuci 3 kali kemudian dikeringkan dengan posisi terbalik beralaskan kertas tissue, tambahkan 100 μ l larutan Conjugate Streptavidin-HRP.

- c. Diinkubasi selama 30 menit pada 37^o C, kemudian dicuci 4 kali dengan larutan dapar pencuci, tambahkan 100 µl larutan kromogen TMB dan akan berubah warna menjadi biru.
- d. Diinkubasi selama 25 menit pada suhu kamar, ditambahkan 100 µl *stopping solutin* dan larutan akan berwarna kuning oranye. Absorben (OD) dibaca pada 450 nanometer menggunakan Elisa Reader.

4.9.7 Pengujian terhadap IL - 4

Prinsip pengujian.

Mengukur fungsi sel T helper-2 dengan cara mengukur IL - 4 yang disekresi dengan metode Elisa.

Komponen sistem imun yang diuji : sel T helper 2

Respon imun yang diuji : respon imun seluler adaptif

Cara kerja.

Kit Elisa yang digunakan "Mouse IL-4 Cytoscreen Immunoassay Kit" dengan nomor katalog KMC 0042, nomor lot 032096

- a. Lempeng mikrotiter dari polistiren yang dilapisi dengan antibodi spesifik terhadap terhadap IL-4 ke dalam tiap-tiap sumuran dimasukkan 100 µl larutan dapar pengencer sebagai kontrol, kemudian 50 µl supernatan dari limfosit yang dirangsang dengan Concanavalin A, atau 50 µl pengenceran larutan standar IL-4,

- tambahkan 50 μ l antibodi anti-IL-4 yang dilabel biotin. Diinkubasikan selama 2 jam pada suhu 37⁰ C.
- b. Dengan larutan dapar pencuci, dicuci 3 kali, kemudian dikeringkan dengan posisi terbalik beralaskan kertas tissue, tambahkan 100 μ l larutan *Conjugate* Streptavidin-HRP.
 - c. Diinkubasikan selama 60 menit pada 37⁰ C, tambahkan larutan kromogen TMB (Tetrametil Benzidin), larutan akan berwarna biru, inkubasikan selama 25 menit pada suhu kamar di tempat gelap.
 - d. Ditambahkan 100 μ l *stopping solution*, warna larutan berubah menjadi kuning oranye.
 - e. Dengan menggunakan Elisa Reader diukur pada lambda 450 nanometer.

4.9.8 Pengukuran kadar hormon kortisol dalam serum mencit

Prinsip Pengujian.

Mengukur cpm kortisol berlabel ¹²⁵I yang terikat pada Anti-Mouse kortisol yang dilapiskan pada partikel padat.

Cara kerja.

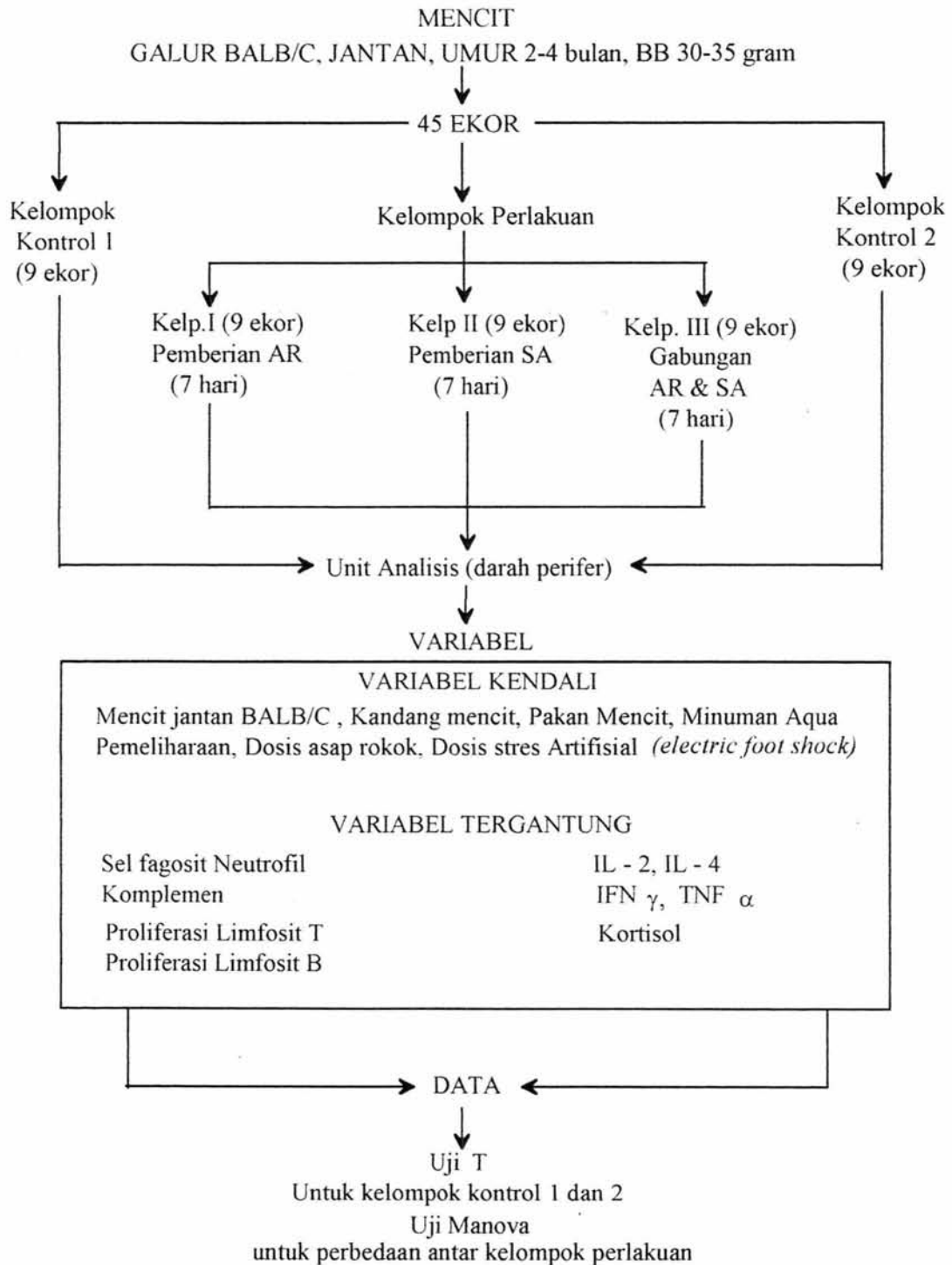
- a. Serum mencit sebanyak 25 μ l ditambahkan kepada partikel padat yang dilapiskan dengan anti-anti-kortisol *Mouse*.
- b. Tambahkan 1 μ l kortisol mouse yang dilabel dengan ¹²⁵I.

- c. Inkubasikan selama 45 menit pada suhu 37^o C dengan menggunakan *waterbath*.
- d. Pemisahan dan pencucian
- e. Penentuan cpm kortisol dengan menggunakan *Gamma Counter*.

4.10 Analisis Data

1. Untuk mengetahui homogenitas data kelompok kontrol 1 (*pretest*) dan kelompok kontrol 2 (*posttest*) dari seluruh variabel digunakan uji - t.
2. Untuk membuktikan perbedaan antar perlakuan dari seluruh variabel digunakan *Multivariate Analysis of Variance (Manova)*.

RINGKASAN PELAKSANAAN PENELITIAN



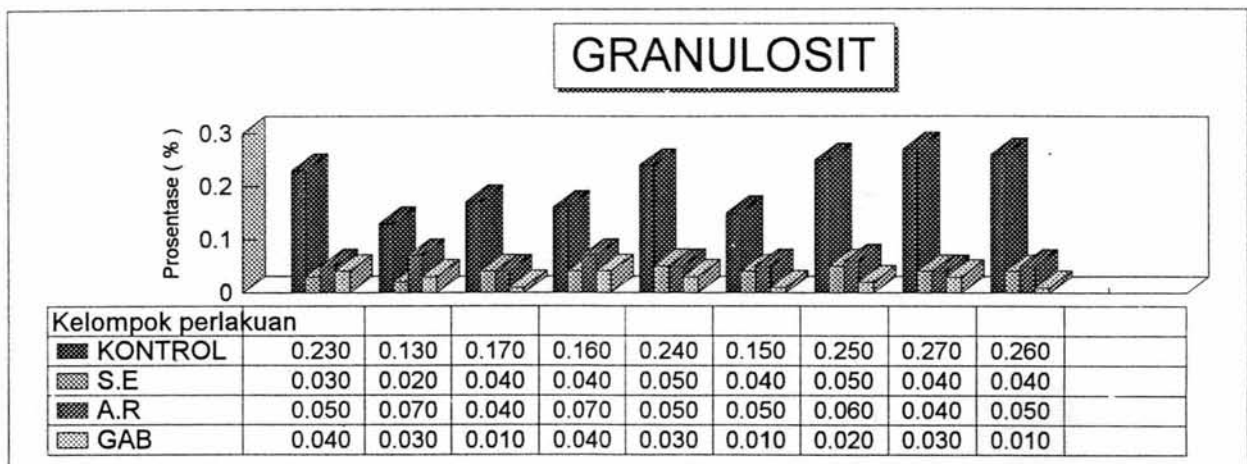
Bab 5

HASIL PENELITIAN

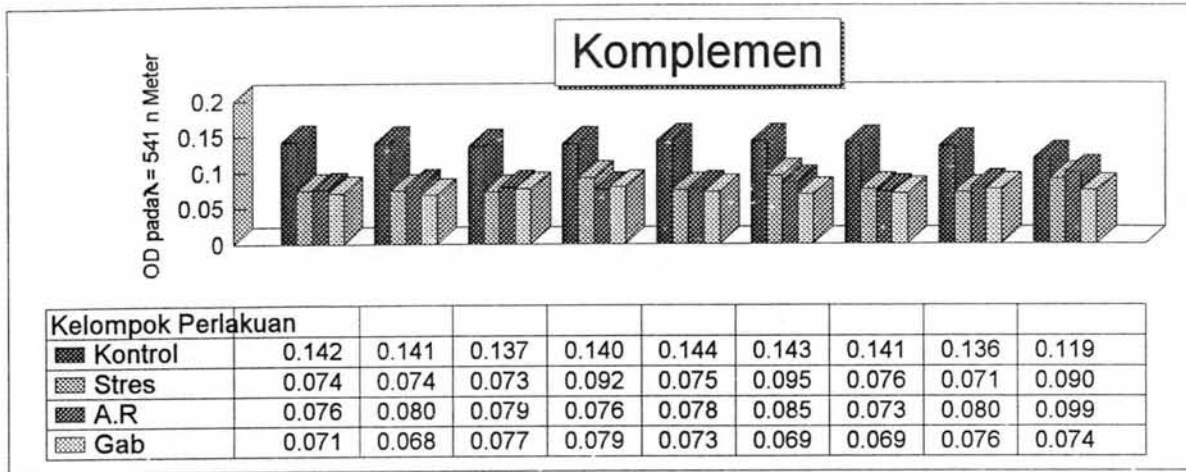
5.1 Hasil homogenitas data kelompok kontrol-1 dan kelompok kontrol-2 (*pretest dan posttest*).

Homogenitas data kelompok kontrol -1 dan kelompok kontrol - 2 (*pretest dan posttest*) dapat dilihat dengan uji t. Hasil uji tersebut menunjukkan tidak didapatkan perbedaan $\alpha > 0.05$ (lihat lampiran 1.2).

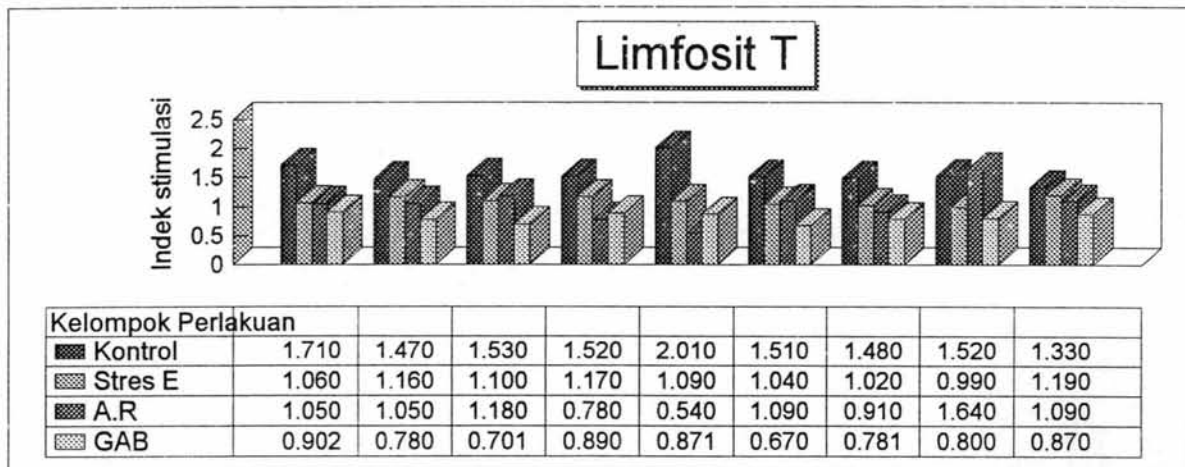
5.2 Hasil uji masing-masing variabel terhadap ke-empat kelompok perlakuan



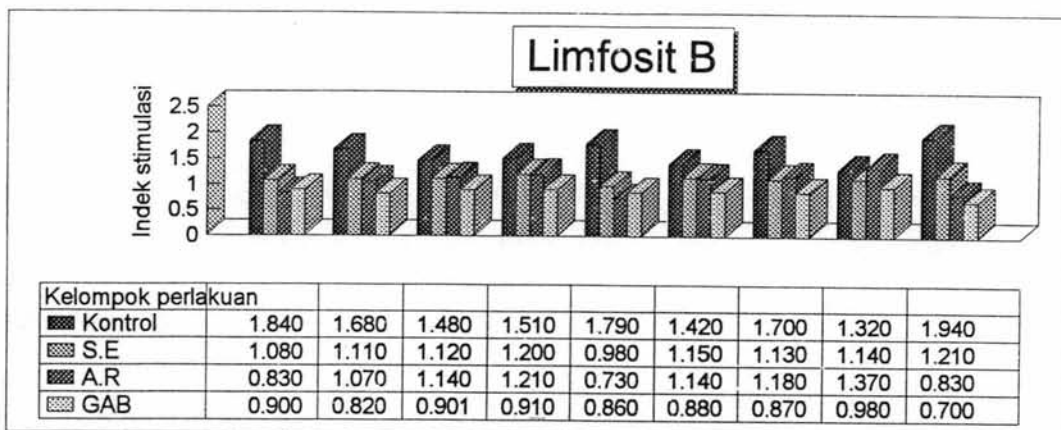
Gambar 5.1 Aktivitas fagositosis sel granulosit neutrofil pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *elctric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



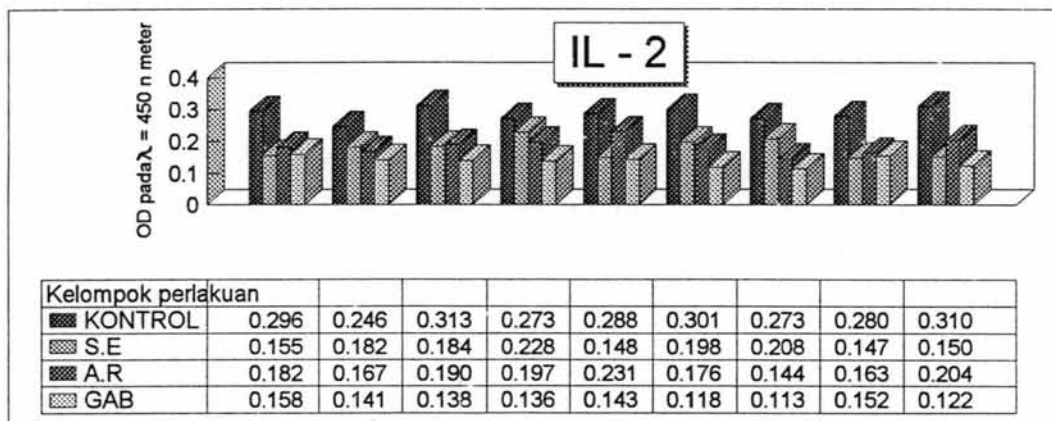
Gambar 5.2 Aktivitas hemolitik total dari komplemen pada populasi mencit kelompok Kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



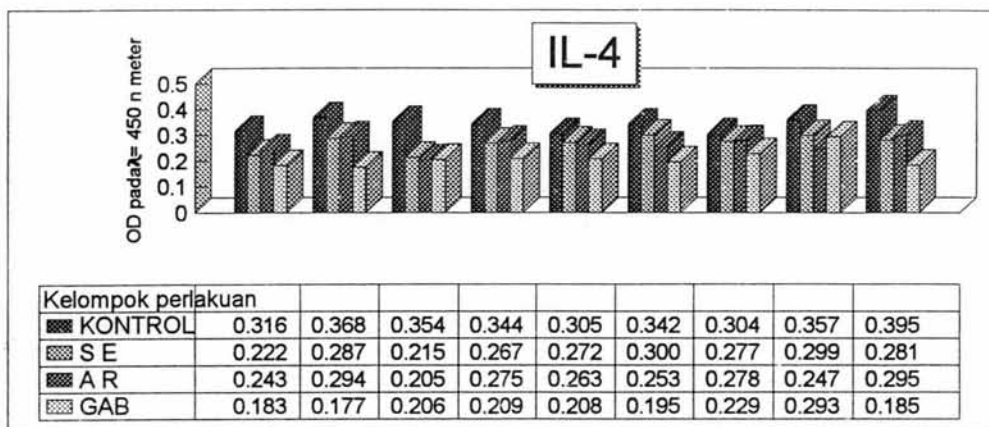
Gambar 5.3 Indeks stimulasi limfosit T setelah dirangsang dengan mitogen Concanavalin A pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock* kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



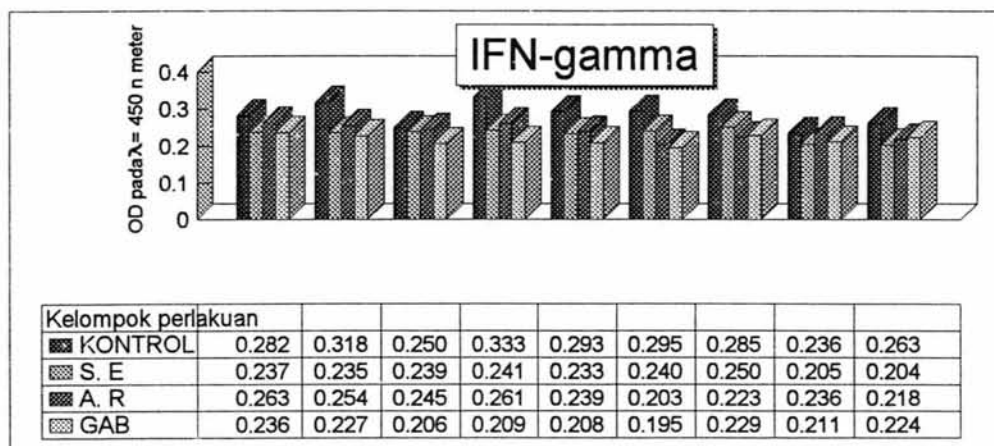
Gambar 5.4 Indeks stimulasi limfosit B setelah dirangsang dengan mitogen Lipopolisakarida (LPS) pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



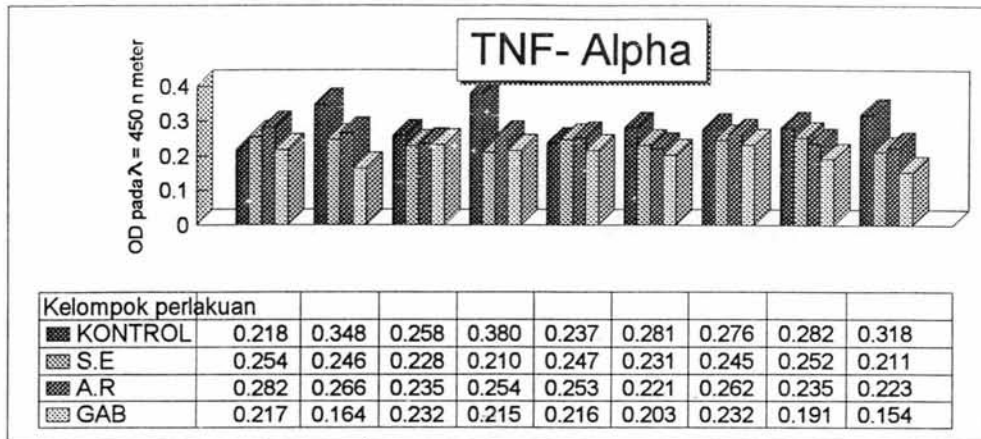
Gambar 5.5 Sekresi IL-2 oleh subset Th-1 pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



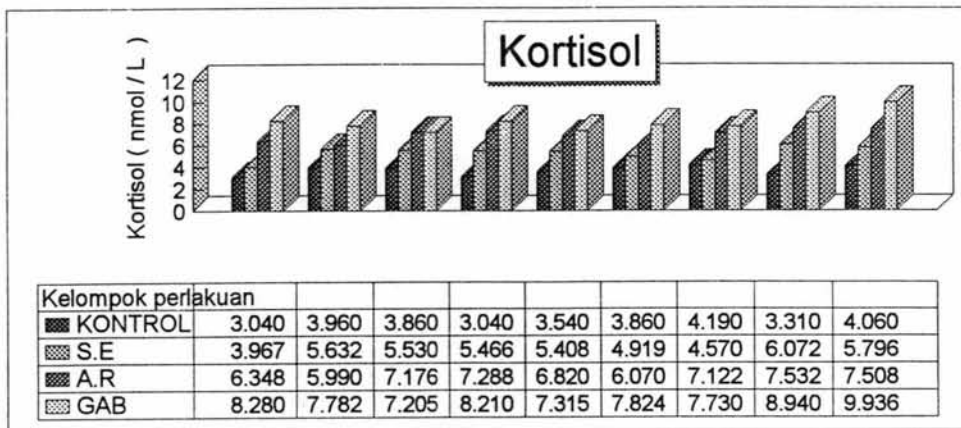
Gambar 5.6 Sekresi IL-4 oleh subset Th-2 pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



Gambar 5.7 Sekresi IFN- γ oleh subset Th-1 pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



Gambar 5.8 Sekresi TNF- α oleh subset Th-1 pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.



Gambar 5.9 Kadar hormon kortisol dalam serum pada populasi mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric* dan asap rokok.

5.3. Perbedaan hasil pengaruh stres *electric foot shock* terhadap respon imun

Tabel 5.1 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok kontrol terhadap variabel yang diteliti dan signifikansi perbedaannya.

Variabel	Kontrol		Stres		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Granulosit	0.21	0.05	0.04	0.01	0,000
Komplemen	0.14	0.01	0.08	0.01	0,000
Limfosit T	1.56	0.18	1.09	0.07	0,000
Limfosit B	1.63	0,20	1.12	0.06	0,000
IL-2	0.29	0.02	0.18	0.03	0,000
IL-4	0.34	0.03	0.27	0.03	0,000
IFN-Gamma	0.28	0.03	0.23	0.02	0,000
TNF-Alpha	0.29	0.05	0.24	0.02	0,011
Kortisol	3.65	0.41	5.26	0.62	0,000

Hasil perhitungan pada kelompok stres diperoleh nilai yang lebih rendah dari pada kelompok kontrol untuk seluruh variabel yang diteliti kecuali kortisol. Pada kelompok stres diperoleh kadar kortisol yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) antara kelompok kontrol dan kelompok stres untuk semua variabel yang diteliti.

5.4 Perbedaan hasil pengaruh stresor asap rokok terhadap respon imun

Tabel 5.2 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stresor asap rokok dan kelompok kontrol terhadap variabel yang diteliti dan signifikansi perbedaannya

Variabel	Kontrol		Asap Rokok		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Granulosit	0.21	0.05	0.05	0.01	0,000
Komplemen	0.14	0.01	0.08	0.01	0,000
Limfosit T	1.56	0.18	1.04	0.28	0,000
Limfosit B	1.63	0,20	1.06	0.13	0,000
IL-2	0.29	0.02	0.18	0.02	0,000
IL-4	0.34	0.03	0.26	0.03	0,000
IFN-Gamma	0.28	0.03	0.24	0.02	0,002
TNF-Alpha	0.29	0.05	0.25	0.02	0,044
Kortisol	3.65	0.41	6.87	0.56	0,000

Hasil perhitungan pada kelompok asap rokok diperoleh nilai yang lebih rendah dari pada kelompok kontrol untuk seluruh variabel yang diteliti kecuali kortisol. Pada kelompok asap rokok diperoleh kadar kortisol yang lebih tinggi dari pada kelompok kontrol.

Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dan kelompok asap rokok untuk semua variabel yang diteliti.

5.5 Perbedaan hasil pengaruh gabungan antara stresor asap rokok dan stres *electric foot shock* pada respon imun.

Tabel 5.3 Perbedaan hasil pengaruh kelompok gabungan asap rokok dan stres dengan kelompok kontrol terhadap variabel yang diteliti serta signifikansi perbedaannya

Variabel	Kontrol		Gabungan		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Granulosit	0.21	0.05	0.02	0.01	0,000
Komplemen	0.14	0.01	0.07	0.004	0,000
Limfosit T	1.56	0.18	0.81	0.08	0,000
Limfosit B	1.63	0,20	0.87	0.07	0,000
IL-2	0.29	0.02	0.14	0.01	0,000
IL-4	0.34	0.03	0.21	0.03	0,000
IFN-Gamma	0.28	0.03	0.22	0.01	0,000
TNF-Alpha	0.29	0.05	0.2	0.03	0,000
Kortisol	3.65	0.41	8.14	0.81	0,000

Hasil perhitungan pada kelompok gabungan asap rokok dan stres *electric foot shock* diperoleh nilai yang lebih rendah daripada kelompok kontrol untuk seluruh variabel yang diteliti kecuali kortisol. Pada kelompok gabungan diperoleh kadar kortisol yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) antara kelompok kontrol dan kelompok gabungan untuk semua variabel yang diteliti.

5.6 Perbedaan hasil pengaruh stres *electric foot shock* dan stresor asap rokok terhadap respon imun.

Tabel 5.4 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok terhadap variabel yang diteliti dan signifikansi perbedaanya.

Variabel	Stres Elektrik		Asap Rokok		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Granulosit	0.04	0.01	0.05	0.01	0,009
Komplemen	0.08	0.01	0.08	0.01	0,879
Limfosit T	1.09	0.07	1.04	0.28	0,603
Limfosit B	1.12	0.06	1.06	0.13	0,368
IL-2	0.18	0.03	0.18	0.02	0,652
IL-4	0.27	0.03	0.26	0.03	0,608
IFN-Gamma	0.23	0.02	0.24	0.02	0,463
TNF-Alpha	0.24	0.02	0.25	0.02	0,200
Kortisol	5.26	0.62	6.87	0.56	0,000

Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok untuk variabel granulosit dan kortisol sedangkan untuk variabel lainnya tidak bermakna ($p > 0,05$).

5.7 Perbedaan hasil pengaruh stres *electric foot shock* dan gabungan terhadap respon imun

Tabel 5.5 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok gabungan terhadap variabel yang diteliti dan signifikansi perbedaannya.

Variabel	Stres		Gabungan		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Granulosit	0.04	0.01	0.02	0.01	0,013
Komplemen	0.08	0.01	0.07	0.004	0,049
Limfosit T	1.09	0.07	0.81	0.08	0,000
Limfosit B	1.12	0.06	0.87	0.07	0,000
IL-2	0.18	0.03	0.14	0.01	0,002
IL-4	0.27	0.03	0.21	0.03	0,002
IFN-Gamma	0.23	0.02	0.22	0.01	0,042
TNF-Alpha	0.24	0.02	0.2	0.03	0,007
Kortisol	5.26	0.62	8.14	0.81	0,000

Hasil perhitungan pada kelompok gabungan secara umum diperoleh nilai yang lebih rendah daripada kelompok stres *electric foot shock* untuk seluruh variabel yang diteliti kecuali kortisol. Pada kelompok gabungan diperoleh kadar kortisol yang lebih tinggi daripada kelompok stres *electric foot shock*.

Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna $p < 0,05$ antara kelompok stres dan kelompok gabungan untuk semua variabel yang diteliti.

5.8 Perbedaan hasil pengaruh stresor asap rokok dan Gabungan terhadap respon imun.

Tabel 5.6 Perbedaan hasil pengaruh kelompok stresor asap rokok dan kelompok gabungan terhadap variabel yang diteliti dan signifikansi perbedaannya.

Variabel	Asap Rokok		Gabungan		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Granulosit	0,05	0,01	0.02	0.01	0,000
Komplemen	0,08	0,01	0.07	0.004	0,015
Limfosit T	0,89	0,17	0.81	0.08	0,042
Limfosit B	0,94	0,13	0.87	0.07	0,025
IL-2	0,18	0,02	0.14	0.01	0,000
IL-4	0,26	0,03	0.21	0.03	0,003
IFN-Gamma	0,24	0,02	0.22	0.01	0,016
TNF-Alpha	0,25	0,02	0.2	0.03	0,001
Kortisol	6,87	0,56	8.14	0.81	0,002

Dari hasil perhitungan pada kelompok gabungan diperoleh nilai yang lebih rendah daripada kelompok asap rokok untuk seluruh variabel yang diteliti kecuali kortisol. Pada kelompok gabungan diperoleh kadar kortisol yang lebih tinggi daripada kelompok asap rokok.

Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna $p < 0,05$ antara kelompok asap rokok dan kelompok gabungan untuk semua variabel yang diteliti.

5.9. Hasil perbedaan pengaruh ke-empat perlakuan terhadap respon imun.

Tabel 5.7 Signifikansi perbedaan ke-empat kelompok perlakuan terhadap variabel yang diteliti

Variabel	p
Granulosit	0,000
Komplemen	0,000
Limfosit T	0,000
Limfosit B	0,000
IL-2	0,000
IL-4	0,000
IFN-Gamma	0,000
TNF-Alpha	0,000
Kortisol	0,000

Hasil perhitungan dari ke-empat kelompok perlakuan terhadap variabel yang diteliti berbeda secara bermakna dengan $p < 0.05$ dan Wilks Lambda 0,0000.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan pada hewan coba mencit tentang pengaruh asap rokok dan stres dalam bentuk *electric foot shock* pada respon imun mencit ternyata dapat menyebabkan penekanan sel-sel imunokompeten. Stres dapat mempengaruhi respon imun melalui hubungan interaksi antara sistem neuroendokrin dengan sistem imun, sehingga stres dikategorikan sebagai modulator sistem imun (Blalock, 1985; Miller, 1989).

Stresor fisik atau psikik yang diterima tubuh akan menyebabkan hipotalamus - hipofisis anterior mensekresi ACTH. Sekresi ACTH akan merangsang korteks adrenal, untuk mensekresi kortisol; sekresi ACTH dan kortisol ke dalam darah dikenal sebagai indikator stres tubuh (Wilson, 1992; Fricchione, 1994; Sigal, 1994; Akil, 1995). Sebagai akibat dari stres yang melalui hubungan sistem neuroendokrin tersebut di atas, maka sel-sel imun adaptif dan imun natural akan dipengaruhi (Felten, 1990).

Pengaruh beberapa stresor terhadap respon imun pada penelitian ini antara lain :

- a. Stresor asap rokok dapat mempengaruhi respon imun melalui nikotin yang merupakan salah satu komponen dari asap rokok. Paparan nikotin pada reseptor nikotik menyebabkan aktivasi beberapa jalur neurohumoral yang akan mengakibatkan pelepasan asetilkolin, norepinefrin, dopamin, serotonin, vasopresin, hormon pertumbuhan (GH) dan ACTH (Pomerleau, 1992). Melalui nikotin dapat meningkatkan hormon kortisol dalam darah. Akibat peningkatan kortisol ini akan menekan respon imun (Claire, 1992; Holbrook, 1994, Henningfield, 1994).
- b. Stres *electric foot shock* dapat menimbulkan pelepasan IL-1 dalam otak yang selanjutnya merangsang CRH dari hipotalamus. CRH akan mengaktifkan hipofise untuk mengeluarkan ACTH, selanjutnya ACTH akan memacu korteks adrenal untuk menghasilkan kortisol. Peningkatan kortisol pada akhirnya akan menyebabkan terjadinya penekanan sel-sel imunokompeten (imunosupresif) (Blalock, 1994).
- c. Gabungan stresor asap rokok dan stres *electric foot shock* menimbulkan efek aditif pada pelepasan hormon kortisol. Kortisol mempunyai reseptor hormon pada permukaan sel-sel limfoid. Mekanisme kerja dari hormon kortikosteroid (kortisol) yang mempengaruhi kecepatan sintesis protein. Molekul hormon masuk ke dalam sel secara difusi pasif kemudian bereaksi dengan reseptor protein di dalam sitoplasma sel dan membentuk

kompleks reseptor steroid. Kompleks ini mengalami perubahan konfirmasi dan akan masuk ke dalam nukleus dan berikatan dengan kromatin. Ikatan ini mengadakan transkripsi DNA membentuk mRNA dan mRNA merangsang sintesis protein yang merupakan bentuk aktif dari kortikosteroid (kortisol). Kortikosteroid bersifat immunosupresif yaitu bersifat menghambat atau toksik terhadap sel-sel limfoid. Dengan demikian hormon steroid (kortisol) yang terbentuk selama stres akan menekan sistem imun (Ader, 1991; Roitt, 1993; Sigal, 1994).

Untuk mengetahui pengaruh stresor terhadap sel-sel immunokompeten dari suatu penelitian hasilnya sangat dipengaruhi oleh metode yang dipakai dalam penelitian tersebut, khususnya metode laboratorisnya.

Pada penelitian uji laboratoris yang ideal harus memiliki sifat sensitivitas maupun spesifitas. Selain itu pengendalian dan pemantapan mutu (kualitas pengujian) uji laboratoris adalah memegang peranan yang sangat penting.

Pada penelitian ini kualitas kontrol pada uji proliferasi limfosit T dan limfosit B digunakan suatu kontrol negatif dan kontrol positif

untuk menunjukkan akurasi dari tes sehingga hasilnya dapat dipertanggungjawabkan.

Pada uji kadar sitokin ditentukan dari cairan supernatan kultur PBMC (*periferal blood mononuclear cells*), pada penelitian ini tidak dilakukan dari plasma / serum dengan alasan adalah :

- a. supernatan PBMC dapat menghindari kelemahan - kelemahan dari asai plasma dan merupakan ukuran yang dapat dipercaya (andal) dari sel - sel tersebut dalam memproduksi sitokin. Seperti diketahui asai sitokin dari plasma / serum banyak kelemahan - kelemahannya.
- b. banyak macam sitokin dapat ditentukan dalam supernatan dari PBMC sehingga dapat memberikan penilaian yang baik mengenai imunokompeten mencit dan dapat memberikan batasan - batasan yang jelas mengenai pola sitokin yang ditekan oleh stres yaitu apakah pola TH1 atau TH2 atau TH1 dan TH2.
- c. kemampuan PBMC untuk mensekresi sitokin invitro menurut literatur terbukti dipengaruhi oleh bahan-bahan atau hal - hal yang menekan (*immunosupressant*) maupun yang merangsang (*immunostimulator*) respon imun (White side, 1994).

Pada penelitian ini penentuan sitokin hanya dilakukan pada cairan supernatan PBMC yang dirangsang dengan Concanavalin A (Con A)

dan Lipopolisakarida (LPS), sedangkan pelepasan sitokin secara spontan (tanpa rangsangan) oleh PBMC dapat menunjukkan bahwa telah dirangsang *invivo*. Dalam penelitian ini PBMC *invivo* ditekan oleh stres, jadi bila *invivo* ditentukan oleh kadar sitokin yang dalam keadaan *immunosuppressed* oleh stres, maka akan sia-sia bila dilakukan asai dari cairan supernatan kultur PBMC yang tidak dirangsang sebab begitu kecil kadarnya sehingga tidak terdeteksi (di bawah daya lacak) oleh metode ELISA yang dipakai.

Adapun kelemahan - kelemahan dari asai sitokin cairan supernatan kultur PBMC adalah :

- a. prosedurnya lama
- b. manipulasi yang ekstensif dan isolasi sel yang meningkatkan resiko pemaparan tenaga laboratorium terhadap bahan-bahan yang infeksius antara lain virus hepatitis,
- c. pencemaran sedikit saja dengan mikroba terutama virus dapat merusak sitokin merupakan inhibitor asai sitokin sehingga pada sintesis sitokin berubah,
- d. faktor lingkungan mikro dari produksi sitokin *invitro* (PBMC) dapat juga mempengaruhi pola sintesis sitokin misalnya ada inhibitor atau sitokin yang *immunosuppressive*.

Dalam pengendalian mutu dari uji laboratorium untuk penentuan kadar sitokin, yang paling ideal bila dilakukan kalibrasi tes terhadap suatu standar rujukan dari WHO disamping standar rujukan yang diberikan oleh pabrik yang terdapat dalam kit. Pada penelitian ini yang diutamakan adalah perbandingan antara kontrol dan perlakuan, dengan teknik yang sama dan standar dari kit yang sama, maka rujukan yang diberikan oleh pabrik yang terdapat dalam kit yang digunakan hal ini masih dapat diterima. Dalam hal ini yang perlu dilakukan pengendalian mutu yaitu presisi antar asai tidak boleh berbeda lebih dari 10 % sehingga hasilnya dapat dipersamakan (sebanding) antara satu run (seri pemeriksaan) dengan seri pemeriksaan yang lain.

Untuk menjaga supaya presisi antara pemeriksaan sekecil mungkin maka dalam tiap seri pemeriksaan yang dipakai adalah larutan supernatan rujukan yang sama dan hasil absorban akhir dari sampel dikoreksi dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Absorban akhir sample X run n} = \frac{\text{Abs. lar. supernatan standar pd run 1}}{\text{Abs. lar. supernatan standar pd run n}} \times \text{Absorban sampel X pd run n}$$

Kemungkinan adanya inhibitor dalam cairan supernatan yang dapat mengganggu asai sitokin diatasi dengan melakukan *spiking* memakai

larutan standar yang telah diketahui kadarnya dan dilakukan uji *recovering* ternyata dalam tiap run tidak ditemukan inhibitor.

Adapun cara membuat larutan supernatan standar pada penelitian ini adalah PBMC (*periferial blood mononuclear cells*) dalam kultur jaringan dirangsang dengan Concanavalin A (Con A) atau Lipopolosakarida (LPS) kemudian diambil cairan supernatannya dan dikalibrasi terhadap standar rujukan, dibagi dalam aliquot kecil-kecil dan disimpan beku pada $-60^{\circ} / -80^{\circ} \text{C}$ (White Side, 1994).

6.1 Pengaruh pemberian stresor pada fungsi fagositosis sel granulosit.

Sel granulosit dikenal juga sebagai sel inflamasi yang mempunyai fungsi utama mengfagosit mikroba atau makromolekul asing yang masuk tubuh, berperan dalam sistem imun natural (Roitt, 1992; Abbas, 1994). Dalam sirkulasi hampir 90 % dari granulosit terdiri dari sel neutrofil. Sel neutrofil merupakan unsur seluler utama dalam inflamasi akut, terutama selama stadium awal respon inflamasi. Granula dalam sitoplasma sel neutrofil mengandung enzim yang dapat mencernakan dan selanjutnya mengeluarkan debris jaringan atau bekerja intraseluler untuk membunuh dan mendegradasi mikroorganisme (David, 1991). Fungsi sel neutrofil antara lain adalah perlekatan (*adherence*),

kemotaksis, fagositosis, degranulasi dan pembunuhan serta penghancuran mikroorganisme.

Jika dihubungkan dengan respon inflamasi terjadinya peningkatan fagositosis, peningkatan aktivasi komplemen, merupakan aktivitas yang saling mendukung dalam meningkatkan respon inflamasi yang merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh yang bersifat alamiah atau natural (Gallin, 1989; Signal 1994).

Respon imun sama seperti respon terhadap inflamasi, dapat berasal dari kerja bermacam-macam sel dan protein dalam sirkulasi, antara lain sel neutrofil, sel eosinofil, sel makrofag, mastosit, trombosit, sel endotel, komponen komplemen, faktor koagulasi, faktor fibrinolisis, dan komponen jalur kinin. Respon inflamasi seluler merupakan mekanisme di mana tubuh berusaha melawan infeksi dan selanjutnya memperbaiki jaringan (David, 1991).

Dari hasil uji fagositosis sel granulosit dengan menggunakan tes NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) pada masing-masing kelompok perlakuan, baik yang diberikan stresor berupa asap rokok, stres dalam bentuk *electric foot shock* maupun yang diberikan perlakuan gabungan asap rokok stres *electric foot shock* menunjukkan penurunan

aktivitas fagositosis yang bermakna ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Pada penelitian ini kelompok perlakuan yang mendapatkan stresor selama tujuh hari, terbukti aktivitas fagositosis dari sel granulositnya lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Antara kelompok perlakuan stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok juga berbeda secara bermakna ($p < 0.05$). Aktivitas fagositosis sel granulosit pada kelompok stres *electric foot shock* lebih rendah dari pada kelompok asap rokok. Penyebab dari perbedaan ini belum diketahui dengan tepat. Mungkin hal ini disebabkan oleh karena stres *electric foot shock* di samping memberi pengaruh pada sistem neurohormonal melalui peningkatan hormon kortisol juga memberikan penekanan langsung pada sumsum tulang, di mana diproduksi granulosit.

Penekanan pada sumsum tulang ini, secara teoritis dapat menekan produksi granulosit atau menurunkan kualitas granulosit yang terbentuk sehingga menurunkan kemampuan fagositosis dari granulosit-granulosit tersebut. Hipotesis ini tentunya perlu dibuktikan dengan penelitian yang lebih lanjut.

Pada kelompok perlakuan gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok untuk variabel granulosit berbeda secara bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok stres *electric foot shock* atau kelompok asap rokok saja ($p < 0.05$). Perbedaan ini mungkin sebagai akibat gabungan dua stresor yang mempunyai efek aditif, sehingga aktivitas fagositosis sel granulosit pada kelompok gabungan lebih rendah dibandingkan masing-masing kelompok perlakuan yang lainnya.

Uji fagositosis sel granulosit dengan menggunakan tes NBT didasarkan pada kenyataan bahwa dalam keadaan normal granulosit yang mengadakan fagositosis akan mereduksi cat NBT menjadi formasan. Endapan formasan akan nampak sebagai bercak hitam dalam sitoplasma granulosit. Endapan ini dapat dilihat pada sediaan hapus yang diwarnai dengan pewarnaan Wright. Jumlah granulosit yang mengandung formasan dalam sitoplasmanya, dinyatakan dengan persen dari seratus granulosit, merupakan kriteria hasil dari tes. Aktivitas fagositosis sel granulosit dapat terlihat dengan kemampuan mereduksi cat NBT menjadi formasan.

Dari hasil yang diperoleh dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian stresor baik sendiri maupun gabungan dapat menekan aktivitas fagositosis sel granulosit, yang merupakan gugus

terdepan dari sistem pertahanan tubuh natural dari mencit. Adapun urutan derajat penekanan dari stresor yang dipakai dalam penelitian ini ialah gabungan kedua stresor, diikuti oleh stres *electric foot shock* dan yang terakhir/terkecil adalah pengaruh dari stresor asap rokok.

6.2 Pengaruh pemberian stresor pada sistem komplemen.

Komplemen merupakan bagian dari sistem imun humoral yang bekerja secara natural dan merupakan bagian dari sistem imun natural (Kuby, 1994). Selain sistem komplemen berperan dalam respon imun natural, sistem komplemen juga berhubungan dengan sistem pertahanan spesifik dan dapat meningkatkan efek penghancuran terhadap benda asing yang berupa mikroorganisme, atau penghancuran *self component* pada reaksi otoimun dan reaksi hipersensitif (Hokama, 1982). Sistem komplemen adalah bagian yang esensial dari pertahanan tubuh yang normal, dan berfungsi sebagai efektor pada respon imun humoral serta proses inflamasi. Sistem komplemen ikut berperan dalam proses fagositosis dan bertanggung jawab pada terjadinya lisis dari sel target (sel mikroorganisme atau sel lain yang pada permukaannya terdapat antigen) (Kinoshita, 1991; Frank, 1993).

Dalam sistem komplemen terdapat hampir 30 protein; protein komplemen maupun protein lain, yang berperanan baik di dalam plasma maupun yang terikat pada membran. Komponen komplemen sendiri terdiri dari protein yang diberi nama dengan C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C7, C8 dan C9. Hampir semua komponen komplemen merupakan senyawa glikoprotein dengan berat molekul tinggi yang mengandung 5 - 10 % karbohidrat. Pada umumnya, komponen komplemen berada di dalam plasma dalam kadar yang rendah, kecuali C4 dan C3. Protein komplemen secara normal ditemukan di dalam plasma sebagai bentuk tidak aktif (proenzim) (Klein, 1982; Hokama, 1982).

Uji hemolitik komplemen yang menggunakan sel darah merah domba dalam bentuk kompleks antigen antibodi dengan anti-sel darah merah domba (hemolisin) dipakai untuk menguji aktivitas jalur klasik dari komplemen. Aktivasi jalur klasik selalu melalui molekul Immunoglobulin (Ig), baik yang membentuk kompleks imun maupun yang berikatan dengan molekul lain, sedangkan imunoglobulin bebas tidak mengaktifasi sistem komplemen. Aktivasi dimulai dengan terjadinya ikatan antara fragmen C1 dengan Ig dan menghasilkan C1s yang akan memecah dan mengaktifasi C4 menghasilkan C4b. C4b akan berikatan dengan proenzim C2 membentuk kompleks enzim C42. Enzim C42 akan dipecah menjadi fragmen C5b. Proses lisis terjadi setelah

fragmen C5b membentuk kompleks dengan fragmen C6 C7 dan C8 membentuk kompleks C5bC678 yang selanjutnya menyusup ke dalam lapisan membran lipid *bi-layer* membentuk lubang hidrofobik. Lubang diperbesar dengan terbentuknya polimerisasi dengan fragmen C9, sehingga lebih banyak lagi cairan yang masuk ke dalam sel, mengakibatkan kematian sel secara osmotik litik (Frank, 1989).

Dari hasil penelitian tentang uji hemolitik total komplemen pada kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan keduanya didapatkan penurunan aktivitas komplemen yang berbeda bermakna ($p < 0.05$) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dengan lain perkataan, pemberian stresor pada mencit dapat menurunkan aktivitas hemolitik total dari komplemen.

Antara kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$). Pada kelompok perlakuan gabungan asap rokok dan stres *electric foot shock* hasilnya berbeda bermakna ($p < 0.05$) bila dibandingkan dengan kelompok stres *electric foot shock* atau dengan kelompok asap rokok tersendiri saja. Dengan demikian pemberian gabungan dua stresor sekaligus dapat lebih menurunkan aktivitas hemolitik total dari komplemen. Menurunnya aktivitas hemolitik total dari komplemen,

berarti menurun pula fungsi biologis dari sistem komplemen. Menurunnya fungsi sistem komplemen dapat mengakibatkan peningkatan kerentanan terhadap infeksi dan penyakit kompleks imun. Reaksi-reaksi biologis yang dipengaruhi komplemen adalah lisis sel target, fagositosis, opsonisasi, penghilangan kompleks imun dari sirkulasi dan reaksi inflamasi karena adanya produk yang bertindak sebagai faktor kemotaksis dan anafilatoksin (Abbas, 1991; Bellanti, 1993; Tizard, 1995).

Dari data yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa stresor, baik gabungan maupun sendiri-sendiri (*electric foot shock* dan asap rokok) dapat menekan aktivitas jalur klasik dari komplemen menciit yang merupakan komponen dari sistem pertahanan tubuh nonspesifik yang penting.

6.3 Pengaruh pemberian stresor pada proliferasi limfosit T.

Dalam respon imun seluler limfosit T yang memegang peranan sebagai sel efektor. Limfosit T terdiri dari berbagai macam subpopulasi. Fungsi efektor limfosit T dikategorikan dalam 2 kegiatan utama :

- a. adanya kontak langsung antar sel yang terlibat
- b. pelepasan mediator solubel.

Limfosit berperan pada berbagai fungsi imunologi yang berbeda yaitu sebagai efektor pada respon imun seluler dan sebagai regulator yang akan mengatur kedua respon imun (Subowo, 1993; Roitt, 1993; Romgnani, 1994). Dengan demikian penurunan aktivitas proliferasi limfosit T dapat mempengaruhi limfosit T dalam fungsi seluler maupun fungsi mediatornya.

Sel limfosit yang terlibat dalam imunitas seluler adalah limfosit T dan semua fenotipenya. Stresor akut menyebabkan penekanan proliferasi limfosit (Ader, 1991). Adanya gangguan proses maturasi sel T dan supresi sistem limfoid diakibatkan oleh tingginya kadar kortisol pada keadaan stres. Penurunan aktivitas proliferasi limfosit T dengan pemberian stresor akan memberikan pengaruh pada respon imun.

Pada penelitian ini hasil uji proliferasi limfosit T menurun pada kelompok perlakuan yang mendapat stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok. Dibandingkan dengan kelompok kontrol hasil tersebut ternyata berbeda bermakna $p < 0.05$. Antara kelompok perlakuan stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok tidak didapatkan perbedaan penurunan aktivitas proliferasi limfosit T yang bermakna ($p > 0.05$). Gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok, memberi penurunan aktivitas proliferasi limfosit T yang lebih

rendah secara bermakna bila dibandingkan dengan masing-masing perlakuan lainnya yaitu stres *electric foot shock* atau asap rokok. Keadaan tersebut dapat disebabkan karena efek supresi sistem limfoid akibat meningkatnya kadar kortisol pada keadaan stres.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian stresor dapat menurunkan aktivitas proliferasi limfosit T invitro, setelah memperoleh rangsangan dari mitogen Concanavalin A (Con-A) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada prinsipnya pengamatan hasil uji proliferasi limfosit adalah mengukur jumlah sel yang berkembang biak dan hidup di dalam kultur yang mengandung bahan stimulator. Pengukuran dilakukan tidak sampai pada tahap mitosis, melainkan hanya sampai pada tahap sintesis DNA dengan cara mengukur sintesis DNA atau produksi DNA yang baru. Pengukuran sintesis DNA dikerjakan dengan cara mengukur jumlah nukleosida radioaktif ^3H Thymidin yang berikatan dengan DNA. Salah satu hasil pengukuran yang paling umum dari pengaruh stres pada sistem imun adalah respon proliferasi dari kultur limfosit dengan standar mitogen sel limfosit T seperti Concanavalin A (Sigal, 1994).

6.4 Pengaruh pemberian stresor pada proliferasi limfosit B

Pengujian proliferasi sel B diukur secara invitro melalui pengukuran jumlah ^3H Thymidine yang berikatan dengan DNA yang beraplikasi di dalam kultur sel. Besarnya Thymidin yang berikatan dengan DNA sebanding dengan derajat sintesis DNA yang berarti proporsional setara dengan derajat pembelahan sel.

Hasil uji proliferasi limfosit B menunjukkan bahwa pemberian stresor selama tujuh hari dapat menurunkan proliferasi limfosit B. Dalam pengujian ini mitogen yang digunakan untuk merangsang limfosit B adalah Lipopolisakarida (LPS), suatu komponen dari dinding sel bakteri gram negatif, tergolong dalam antigen *Thymus Independent* (TI), yang berarti dapat menstimulasi limfosit B tanpa memerlukan adanya limfosit T (Abbas, 1994).

Dari hasil penelitian didapatkan aktivitas proliferasi limfosit B menurun pada ketiga kelompok perlakuan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$). Antara kelompok perlakuan stres dan asap rokok hasilnya hampir sama ($p > 0.05$). Pada kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok, aktivitas proliferasi limfosit B menurun secara bermakna ($p < 0.05$), bila dibandingkan dengan kelompok stres *electric foot shock* atau

kelompok asap rokok saja. Keadaan ini disebabkan karena meningkatnya kadar kortisol pada keadaan stres dapat mengganggu proses maturasi dan memberikan supresi pada sistem limfoid.

Dari hasil uji proliferasi limfosit B didapatkan perbedaan pada kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok bila dibandingkan dengan kelompok stres *electric foot shock* atau kelompok asap rokok saja. Kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok menunjukkan hasil yang lebih rendah daripada masing - masing kelompok. Secara nalar dapat dimengerti bahwa gabungan dari dua stresor akan memberikan derajat stresor yang lebih besar daripada masing-masing stres tersendiri. Akibatnya produk kortisol pada gabungan stresor tersebut juga akan lebih tinggi sehingga memberikan penekanan yang lebih berat pada kemampuan proliferasi limfosit B. Penurunan aktivitas proliferasi limfosit B sampai batas tertentu dapat menyebabkan terjadinya penurunan produksi antibodi humoral walaupun dalam penelitian ini tidak diuji. Menurunnya aktivitas proliferasi limfosit B dapat pula menurunkan fungsi dari limfosit B untuk mengenal suatu antigen dan fungsi fisiologis antibodi untuk menetralkan dan mengeliminasi antigen - antigen yang masuk ke dalam tubuh (Kuby, 1992; Roitt, 1993).

Dari hasil yang diperoleh dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa stresor, baik gabungan maupun *electric foot shock* atau asap rokok tersendiri dapat menurunkan secara bermakna aktivitas proliferasi limfosit B. Secara nalar penurunan aktivitas proliferasi limfosit B ini dapat menurunkan produksi antibodi humoral, sehingga pemberian stresor pada mencit dapat menurunkan respon imun humoral.

6.5 Pengaruh pemberian stresor pada fungsi Limfosit T-helper.

Pemberian stresor dapat menekan subset limfosit T-helper (Th), yaitu Th-1 dan Th-2. Peran sentral limfosit T dalam mengatur respon imun seluler dan humoral dihasilkan melalui proses aktivasi dan ekspansi klonal dari limfosit T helper (Th).

Aktivasi limfosit T-helper (Th) diawali dari interaksi antara kompleks TCR - CD3 pada permukaan limfosit T-helper (Th) dengan kompleks molekul MHC kelas II dan peptida (Antigen) yang dipresentasikan oleh sel penyaji *antigen precenting cells (APC)*. Limfosit T-helper (Th) yang teraktivasi akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor subset Th-1 dan Th-2 yang mensekresi berbagai macam limfokin. Fungsi efektor limfosit T-helper sebagian besar diatur oleh profil sekresi limfokin. Sekresi limfokin yang berbeda, menyebabkan fungsi yang dikerjakannya akan berbeda pula (Romagnani, 1994). Perbedaan

profil sekresi limfokin di antara subset limfosit T-helper (Th) memegang peranan penting dalam regulasi respon imun (Abbas, 1994).

Untuk membedakan respon imun Th-1 dan Th-2 dipakai profil pola sekresi limfokin yang ada, seperti Th-1 mensekresi IL-2, TNF- α dan IFN γ , sedang Th-2 mensekresi IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10. Dengan demikian Th-1 cenderung untuk mengaktivasi makrofag sehingga dapat menghancurkan atau mencerna antigen yang difagositosis oleh makrofag. Jadi bersifat imunoprotektif. Sekresi Th-2 akan mengaktivasi sel B untuk memproduksi antibodi. Pengaruh pemberian stresor menyebabkan peningkatan kadar hormon kortisol. Stres telah diketahui dapat menekan sistem imun seluler dan humoral yaitu lewat sistem imun adaptif seluler seperti Th-1 dan Th-2 (Roitt, 1993; Kuby, 1994).

Pada keadaan stres, peningkatan kadar hormon kortisol dapat juga mengurangi sirkulasi limfosit dan menurunkan produksi antibodi dan aktivitas sel T-helper (Th) maupun sel T sitotoksik (Vander, 1994). Pada penelitian ini pemberian stresor menunjukkan pengaruh pada beberapa sekresi limfokin dari subset Th-1 dan Th-2. Efek biologis yang terjadi dari profil sekresi limfokin setelah pemberian stresor selama tujuh hari adalah seperti uraian berikut ini.

6.5.1 Interleukin-2 (IL-2)

Dari hasil penentuan kadar IL-2 dalam cairan supernatan dari kultur sel-sel mononuklear mencit kelompok perlakuan yaitu kelompok stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok menunjukkan adanya penurunan kadar IL - 2 yang berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$). Antara kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok tidak didapatkan perbedaan hasil yang bermakna ($p > 0.05$). Sebaliknya bila kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok dibandingkan dengan kelompok stres *electric foot shock* atau dengan kelompok asap rokok saja didapatkan hasil yang berbeda bermakna ($p < 0.05$). Gabungan dari dua stresor menunjukkan penurunan sekresi IL-2 yang lebih besar secara bermakna bila dibandingkan dengan masing-masing stresor tersendiri.

IL-2 sebelumnya dikenal sebagai TCGF (*T-Cell Growth Factor*) yang bertanggung jawab terhadap pertumbuhan limfosit T, bersifat otokrin terhadap limfosit T itu sendiri dan bersifat parakrin terhadap sel-sel di sekitarnya termasuk limfosit T sitotoksik. IL-2 menstimulasi pertumbuhan sel NK. Terhadap limfosit B, IL-2 bertindak sebagai faktor pertumbuhan dan menstimulasi sintesis antibodi dan merupakan faktor pertumbuhan yang paling potensial untuk limfosit B (Kishimoto,

1989). Dengan demikian pemberian stresor akan menyebabkan stres dan akibatnya terjadi penurunan sekresi IL-2 oleh subset Th-1.

6.5.2 Interleukin - 4 (IL-4)

Penentuan kadar IL-4 pada cairan supernatan dari kultur sel mononuklear kelompok perlakuan stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok memberikan hasil yang berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$). Pada kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok tidak didapatkan perbedaan hasil yang bermakna ($p > 0.05$). Sebaliknya pada kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok didapatkan perbedaan hasil yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok stres *electric foot shock* maupun kelompok asap rokok tersendiri ($p < 0.05$). Dengan lain perkataan kelompok gabungan memberikan penurunan sekresi IL-4 yang lebih besar secara bermakna bila dibandingkan dengan masing - masing stresor tersendiri.

IL-4 menstimulasi pertumbuhan limfosit B, IL-4 juga meningkatkan sekresi dari IgG dan IgE (Sigal, 1994). Pemberian stresor pada penelitian ini menunjukkan penurunan sekresi IL-4, sehingga dapat pula menurunkan proliferasi limfosit B dan sekresi antibodi humoral.

6.5.3 Interferon Gamma (IFN γ).

Dari hasil penentuan kadar IFN γ dalam cairan supernatan dari kultur sel-sel mononuklear pada kelompok stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok terdapat penurunan sekresi IFN γ yang berbeda bermakna ($p < 0.05$) dengan kelompok kontrol. Dengan kata lain telah terjadi penurunan sekresi IFN γ pada mencit yang diberi stresor. Pada kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok tidak didapatkan perbedaan sekresi IFN γ yang bermakna ($p > 0.05$). Perbedaan sekresi IFN γ antara kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok dengan kelompok stres *electric foot shock* atau kelompok asap rokok dalam penelitian ini ternyata bermakna dengan $p < 0.05$, yang berarti bahwa pada kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok didapatkan penurunan sekresi IFN γ yang lebih bermakna daripada masing-masing stresor tersendiri.

Pemberian stresor menyebabkan penurunan sekresi IFN γ sehingga menurunkan pula fungsi dari IFN γ . IFN γ merupakan sitokin yang dapat meningkatkan maturasi dari limfosit T sitotoksik dan dapat meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I pada sel target (Whiteside, 1992). Limfosit T sitotoksik dalam melakukan fungsi sitotoksitasnya terhadap sel target, seperti sel tumor dan sel yang

terinfeksi virus memerlukan proses maturasi dan adanya molekul MHC kelas I yang mempresentasikan peptida dari sel target (Berke, 1989). Dengan demikian pemberian stresor yang mengakibatkan stres menyebabkan penurunan sekresi IFN γ sehingga tidak dapat meningkatkan aktivasi makrofag dan sel T sitotoksik.

6.5.4. Tumor necrosis factor alpha (TNF α)

TNF α terutama diproduksi oleh makrofag dan monosit, sumber yang lain adalah sel limfosit T. TNF α adalah juga faktor pertumbuhan untuk fibroblas. TNF adalah suatu mediator untuk imunitas alami atau natural dan imunitas spesifik atau adaptif. TNF juga merupakan mediator yang penting guna menjembatani respon imun adaptif dengan proses inflamasi akut. TNF dapat bertindak seperti interferon dalam hal melakukan proteksi terhadap infeksi virus dan meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I serta meningkatkan kemampuan lisis dari *Cytotoxic T Lymphocytes* (CTL) (Abbas, 1994; Tizard, 1995).

Pemberian stresor pada kelompok perlakuan menyebabkan stres yang kemudian dapat menurunkan produksi TNF α . Dengan demikian, dapat menurunkan imunitas natural dan menurunkan ekspresi molekul MHC kelas I yang berarti dapat pula menurunkan fungsi sitotoksitas dari limfosit T Sitotoksik.

Hasil penentuan kadar TNF α dalam cairan supernatan dari kultur sel-sel mononuklear pada kelompok stres *electric foot shock*, kelompok asap rokok dan kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok menunjukkan penurunan sekresi TNF α yang berbeda bermakna ($p < 0.05$), bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan penurunan sekresi TNF α pada kelompok stres *electric foot shock* dan kelompok asap rokok tidak bermakna ($p > 0.05$). Antara kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok dengan kelompok perlakuan stres *electric foot shock* atau asap rokok didapatkan perbedaan hasil yang bermakna dengan $p < 0.05$. Dengan demikian pengaruh pemberian stresor pada kelompok perlakuan menunjukkan penurunan sekresi TNF α yang bermakna.

Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa pemberian stresor selama tujuh hari menyebabkan stres pada mencit dan mempengaruhi profil sekresi limfokin dari subset Th-1 dan Th-2 sebagaimana yang dapat dibuktikan dari hasil penelitian ini.

6.6 Parameter hormon kortisol sebagai indikator stres.

Pada penelitian ini kelompok perlakuan yang mendapat stresor selama tujuh hari berupa stres *electric foot shock*, asap rokok dan gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok didapatkan kadar

kortisol yang meningkat tinggi dan berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan ($p < 0.05$). Antara kelompok stres *electric foot shock* dengan kelompok asap rokok terdapat perbedaan peningkatan kadar kortisol yang bermakna ($p < 0.05$). Dalam hal ini tampaknya mencit lebih sensitif terhadap stresor asap rokok sehingga didapatkan kadar kortisol yang lebih tinggi secara bermakna daripada kelompok stres *electric foot shock*. Kelompok gabungan stres *electric foot shock* dan asap rokok menunjukkan peningkatan kadar kortisol yang lebih tinggi secara bermakna ($p < 0.05$) daripada kelompok stres *electric foot shock* atau kelompok asap rokok sendiri.

Dari hasil penelitian ini terbukti bahwa gabungan dua stresor akan menghasilkan efek aditif dalam pelepasan hormon kortisol. Kejadian apa saja yang dapat mengakibatkan peningkatan sekresi hormon kortisol disebut stres (Sigal, 1994; Vander, 1994).

Stresor psikik dan fisik yang diterima tubuh akan menyebabkan hipotalamus - hipofisis anterior mensekresi ACTH. Sekresi ACTH dapat merangsang korteks adrenal mensekresi kortisol. Dengan demikian sistem saraf pusat merupakan titik tangkap terhadap beban stres fisik dan stres psikik, keadaan ini dapat diwakili oleh parameter ACTH dan kortisol (Basedowsky, 1992; Akil, 1995).

Respon terhadap stres, baik secara fisik ataupun psikologik akan meningkatkan sekresi kortisol dari korteks adrenal dan aktivasi dari sistem saraf simpatik termasuk pelepasan epinefrin oleh medulla adrenal. Hormon lain yang dilepaskan selama stres termasuk aldosteron vasopresin, glukagon, growth hormon dan prolactin (Vander, 1994). Peningkatan sekresi kortisol akibat stres dapat mempengaruhi respon imun melalui hubungan interaksi antara sistem neuroendokrin dan sistem imun, sehingga stres dikategorikan sebagai modulator sistem imun (Blalock, 1985; Miller, 1989).

Pengaruh stres pada respon imun terutama disebabkan oleh peningkatan kadar hormon kortisol (Vander, 1994). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kombinasi stres psikologik dan merokok menimbulkan efek aditif pada pelepasan kortisol (Pomerleau CS, 1990). Dari data yang diperoleh dalam penelitian ini dan dibahas di sini, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut.

Stresor asap rokok dapat menurunkan respon imun adaptif maupun natural, baik humoral maupun seluler, dan pola TH₁ maupun TH₂. Dengan demikian hipotesis pertama penelitian ini telah terbukti.

Stresor fisik *electric foot shock* juga dapat menurunkan respon imun adaptif maupun natural, baik humoral maupun seluler dan pola

TH1 maupun TH2. Dengan demikian maka hipotesis kedua penelitian ini telah terbukti.

Stresor gabungan dari kedua tersebut di atas juga terbukti dapat menurunkan respon imun, natural maupun adaptif, baik humoral maupun seluler serta pola TH1 maupun TH2. Dengan demikian maka terbukti hipotesis ketiga penelitian ini.

Bab 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian eksperimental pada mencit dan pembahasan tentang pengaruh stresor berupa stres *electric foot shock* dan asap rokok pada respon imun mencit dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Pemberian stresor berupa asap rokok pada kelompok asap rokok selama tujuh hari terbukti dapat menurunkan aktivitas sel-sel imunokompeten pada mencit dan terdapat perbedaan yang bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Pemberian stresor berupa *electric foot shock* selama tujuh hari pada kelompok stres terbukti menunjukkan penurunan aktivitas sel-sel imunokompeten pada mencit yang berbeda secara bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Pemberian gabungan dua stresor yaitu asap rokok dan stres *electric foot shock* selama tujuh hari terbukti lebih menurunkan aktivitas sel-sel imunokompeten bila dibandingkan dengan kelompok stres dan kelompok asap rokok.

4. Pada kelompok mencit yang mendapatkan perlakuan stres *electric foot shock* hasilnya hampir serupa dengan kelompok asap rokok dalam hal penurunan aktivitas sel-sel imunokompeten.
5. Pengaruh pemberian stresor mengakibatkan peningkatan sekresi hormon kortisol dan menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol.
6. Pemberian gabungan dua stresor menyebabkan efek aditif dalam peningkatan sekresi hormon kortisol sebagai manifestasi respon neuroendokrin terhadap stres.
7. Peningkatan sekresi hormon kortisol terbukti menyebabkan penurunan aktivitas sel-sel imunokompeten yang berarti terjadi penurunan respon imun.
8. Pemberian stresor yang berulang dengan dosis yang meningkat selama tujuh hari pada penelitian ini menunjukkan bahwa didapatkannya penurunan respon imun.

7.2 Saran

Berdasarkan simpulan tersebut di atas dapat diberikan saran - saran sebagai berikut.

1. Perlu pengembangan penelitian lebih lanjut pada manusia agar hasilnya dapat diterapkan pada manusia, dengan memperhatikan

faktor - faktor etis, sehingga sasarannya dapat membuktikan pengaruh stres yang lebih lengkap terhadap penurunan respon imun. Dengan demikian hasilnya dapat dijadikan strategi untuk meningkatkan kualitas sumber daya manusia dalam upaya menghindari kebiasaan yang dapat menurunkan daya tahan tubuh.

2. Dalam keadaan stres hindarilah merokok dalam upaya menghilangkan stres, oleh karena stres dan merokok keduanya dapat menurunkan respon imun.
3. Pengaruh stresor asap rokok, stres *electric foot shock* dan bentuk stres yang lain terhadap respon imun perlu pengkajian lebih komprehensif hingga ke tingkat biomolekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Paber JS, 1994. **Cellular and molecular Immunology**, Philadelphia, WB Saunders Company, 237-294.
- Ader, 1991. **Psychoneuroimmunology**, second edition, Academic Press. Inc, New York.
- Akil HA and Morano MI, 1995. Stres . In (Bloom FE, and Kupfer Dj. eds) **Psychopharmacology the Fourth Generation of Progress**. New York: Reven Press, pp 773 - 785
- Armitage AK, Dollery CT, Goerge CF, Houseman TH, Lewis PJ, and Turner DM, 1975. Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. **Br Med J** ,4: 313 - 316.
- Basedowsky OH, 1992. Introduction Psychoneuroimmunology an Overview. In (Schmoll MJ, eds) **Psychoneuroimmunology**. Leilisten: Hogrefe and Muber Publishers. pp 13 - 16
- Bastian RJ, and Reade PC, 1976. The Effect of Tobacco Smoking on Oral and Dental Tissues, **Australian Dental Journal Vol 21 No.4**, pp 308 - 315.
- Bellanti, 1985. **Immunology III**. Igaku-Shoin/Saunders International Edition. WB Saunders Company, 1 - 218.
- Bellanti JA, 1993. **Immunologi III**, Terjemahan oleh Wahab S, Cetakan I, Yogyakarta ; Gajah Mada University Press, hal 114 - 125, 186 - 188.
- Benowitz NL, 1980. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. **New Engl J Med** 319 : 1318 - 1330.
- Berczi I, Nagy E, 1991. Effect of Hypophysectomy on Immune Function. In **Psychoneuroimmunology**, edited by Robert Ader, second Edition, New York : Academic Press, Inc, .336 - 339.
- Bieliauskas LA, 1982. **Stress and Its Relationship to Health and Illness**. Colorado:Westview. pp 9 - 97.

- Blalock JE, 1984. The Immune System As a Sensory Organ. **The Journal of Immunology**, **132**, No. 3, 1067 - 1070.
- Blalock JW and Smith EM, 1985. A Complete Regulatory Loop Between The Immune and Neuroendocrine Systems, **Fed Proc. Vol.44(1)**; 108 - 111
- Blalock PH, 1994. **Central Nervous System-Immune System Interaction Psychoneuro endocrinology of stress and Its Immune Consequences.** Antimicrob-Agent. Chemother 38(1): 1-6.
- Blalock, JE, 1994. The Syntax of Immune neuroendocrine Communication, **Immunology today Vol. 15 No. 11**, 503 - 552 (173)
- Bloom .BL, 1988. **Health Psychology. A Psychosocial Perspective.** Prentice Hall Englewood Cliffs, New Jersey. pp 74 - 77; 150 - 180
- Breier, et.al 1987. Controllable an Uncontrollable Stress in Human : Alterations in Mood and Neuroendocrine and Psychopsycological Function. **Am J Psychiatry, November, 144**:11.
- Carlson NR, 1994. Philosophical Roots of Physiological Psychology In (Tifh, eds) **Physiology of behavior** Boston: allyn and Bacon, pp 2 - 4, 235 - 250, 231 - 370.
- Chandrasoma P, Taylor CR, 1991. **Condise Pathology.** International Edition, a Lange Medical Book, Prentice-Hall International, Inc, .33 - 104.
- Christen AG, 1970. The Effect of Tobacco on Oral Tissues, **JADA 81**, pp 1378 - 1382.
- Claire CT, 1996. **Evaluating tobacco control activities, Experiences and guiding principles.** World Health Organization Geneva. pp 2 - 4.
- Claire CT, 1992. **Women and tobacco** World Health Organization. Geneva. pp 6 - 8; 31 - 43.
- Clamen HN, 1987. The Biology of The Immune Response **JAMA 258(20)**;268(2):200

- Clemens MJ, 1991. **Cytokines**, Oxford Bios Scientific Publisher Limited.
- Cohen JJ, 1987. Immunity and Behavior. **The J of Allergy and Clinical Immunology** 75 (1): 2-5.
- Comroe JH, 1960. The Pharmacological Action of Nicotine. **Ann NY acad Sci** 90 : 48 - 51.
- Daleva M, 1987. Metabolic and Neurohormonal Reactions to Occupational Stress. In (Kalimo R; El-Batawi MA; Cooper CL, eds). **Psychosocial Factors at Work**. Geneva; WHO. pp 48.
- Daniel, Wayne W, 1987. **Biostatistic : A Foundation for Analysis in The Health Sciences**. Fourth Ed. John Wiley & Sons.
- David MB, 1991. Inflammatory Cells : Structure and Function. **In Basic and Clinical Immunology**. eds. Stites DP, Terr AI, 7th edition. Prentice Hall International Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, pp 141 - 145.
- Djamburi. A, 1989. Perbedaan gambaran Histologik saluran napas tikus putih pada pemberian asap rokok sigaret dan rokok kretek. **Majalah Farmakologi dan Terapi Indonesia Suppl.** 6 : 94
- Falaschi P, Martocchia A, Proichi A, Pastore R, et al , 1994. Neuroendocrinoimmunology, **Ann Hal Med Int** 9; 96 - 99.
- Felten S, 1990. Innervation of Lymphoid Tissue In : (Ader R, Felten DL, Cohen N, eds). **Psychoneuroimmunology**, New York : Boston. Academic Press, INC. pp 27 - 70.
- Fraser J, Nadeau J, Robertson D and Wood JJ, 1981. Regulation of Human Luekocyte Beta Receptors By Endogenous Catecholamines. **Society Clin. Inv.** 67 : 1777 - 1784.
- Fricchione GL ; Stefano GB, 1994. The Stress Response Antoimmunoregulation. **Adv - Neuroimmunol**, 4(1); 13 - 27.
- Gallin JL, 1989. Inflammation. In (Pula WE) **Fundamental Immunology**, 2nd edition. Raven Press ; 721 - 734.

- Gaudin AJ and Jones KC. 1989. **Human Anatomy and Physiology**. San Diego: Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, pp 290 - 303.
- Goetzl EJ. 1987. Leukocyte Receptors for Lipid and Reptide Mediators, **Federation Proc** 46(1): 190 - 191.
- Goodman JW, 1991. The Immune Response. In **Basic Human Immunology**, first Edition, Prentice-Hall International, Inc, 34 -44.
- Greenspan FS and Baxter, 1994. Basic and Clinical Endocrinology, 4th edition, London ; Prentice-Hall International, 1 - 7 ; 71 - 72.
- Henningfield JE, Schub LM and Jarvik ME, 1995. Pathophysiology of Tobacco Dependence. In (Bloom FE and Kupfer Dj.eds) **Psychopharmacology the Fourth Generation of Progress**. New York : Reven Press. pp 1715 - 1727.
- Henry JP, 1993. Biological Basis of The Stress Respon. **New in Phys. Sci (NIPS)** 8 : 69.
- Hirayama Takeshi, 1988. Smoking and Health in Japan. Determined and Smoking Action needed. **Topics in Japan**.
- Hoepoedio RS, 1985. Mengurangi resiko merokok, **Medika** 11 : 615 - 617
- Holbrook JH, 1994. Nicotine Addiction In Harrison's Principles of Internal Medicine 13th Edition, pp 2433 - 2437
- Hokama Y and Nakamura MR, 1982. Immunology and Immunopathology Basic Concept. 1st edition. Boston ; Little Brown and Co., pp 135 - 157 183 - 187 ; 192 - 245.
- Hudson L, Hay FC, 1976. **Practical Immunology**, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburg Melbourné, 43-65.
- Hudson L, Hay FC, 1989. **Practical Immunology** Third Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburg Melbourne, pp 447-454.
- Hume CW, 1972. **The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animal**. 4th edition, Churchill Livingstone, .204

- Imam Soedarwo, 1991. Latar Belakang, motivasi dan Pengaruh Sosial Ekonomi Tenaga Kerja Sektor Rokok terhadap Pendapatan Masyarakat dan Negara. Seminar Peranan Sosial Ekonomi Industri Rokok Menyongsong Pembangunan Nasional 25 Tahun Kedua, Jakarta 2 - 4 Mei.
- Irwin MR, 1992. Depression: Role of Corticotropin Releasing Factor in the Reduction of Natural Killer Cell Activity. In: Schmoll HJ. **Psychoneuroimmunology**. Lewiston: Hogrefe and Huber Publishers, pp 107 - 126.
- Irwin, 1995. Psychoneuroimmunology of Depression In (Bloom FR, and Kupper DJ, eds) **Psychopharmacology The Fourth Generation of Progress**. New York. 339 - 336.
- Jarvis WD, 1990. Neuro Immune - Neuroendocrine Interactions, **Prog. Neuro Endocrinol Immunol 3**: 65 - 67
- Jaffe SH and Sherwin SA, 1991. Immunomodulators. In (Stites DP, Terr AI) **Basic and Clinical Immunology**. Seventh edition, A large Medical Book, Prentice-Hall International Inc., 780 - 786.
- Johnson BD, Engel D, 1986. Acute Neurotizing Ulerative Gingivitis, A Review of Diagnosis Etiology and Treatment, **J Periodontal Vol 57, No.3 . March**; pp 141 - 149.
- Joseph SA, Pilcher WH and Knigge KM, 1985. Anatomy The Corticotropin Releasing Factor and Opiomelanocortin System of the Brain, **Fed, Proc 44 (1)**: 100 - 107.
- Kincade PW, Gimble JM, 1989. **B Lymphocyte In (Pula WE) Fundamental Immunology**, 2nd Edition Raven Press. pp 41 - 55.
- Kinoshita T, 1991. Biology of Complement ; **The Overtune Immunology Today 12** : 291 - 294
- Kishimoto T, Hirano T, 1989. B Lymphocyte Activation proliferation and Immunoglobulin Secretion. In (Pula WE) **Fundamental Immunology**, 2nd edition Raven Press. pp 385 - 300.

- Klein J. 1990. **Immunology** Blackwell Scientific Publication, pp 227 - 409.
- Kuby J, 1992. **Immunology**, New York : Freeman and Company.
- Kuby J, 1994. **Immunology** W.H. Freeman and Company. pp 239 - 367.
- Lockey and Bukante, 1987. **Fundamentals of Immunology and Allergy**, Philadelphia : WB Saunders Co, 7 - 37
- Lyte M, Lysle DT, Fowler H, Robin BS, 1987. Shock - induced modulation of lymphocyte reactivity ; **Suppression, habituation and recovery Life Sciencer, 41** : 1805 - 1814.
- Mackay JL, 1986. **Proceeding**. The 14th International Cancer Congress. Budapest. Augst.
- Maddox J. 1984. Psychoimmunology Before Its Time. **Nature 309**:400.
- Male. D, 1991. **Immunology**, 2nd Ed. London :Gower Medical Publishing. pp 1 - 20, 27 - 28, 47 - 73.
- Martin JB and Reinchlin S, 1987. **Clinical Neuroendocrinology**. Philadelphia: FA Davis Company, pp 639 - 690.
- Matsukura S, 1984. Effects of environmental tobacco smoke on urinary cotinine excretion in nonsmokers; evidence for passive smoking; **New England Journal of Medicine, Vol 311, no. 13**, pp 823 - 832.
- McGills JP. Organist ML and Payan DG, 1987. Substance P and Immunoregulation. **Fed. Proc, Vol 46**: 196 - 199.
- McManus IC, 1992. **Psychology in Medicine**, Butterworth - Heinemann Ltd London pp 193 - 207; 225 - 232.
- Miller AH, and Norin AJ, 1989. Neural Immune Interaction In. (Miller AH, eds); **Depressive Disorders and Immunity**, Washington: American Psychiatric Press Inc. pp 25-49.
- Munk A, 1990. Glucocorticoid and Immune Fuction. In (Ader R, Felten DL, Cohen N, eds). **Psychoneuroimmunology**. New York; Boston. Academic Press, Inc pp447 - 474.

- Neveu PJ, 1992. Lateralization and Immunomodulation. In. (Schmoll HJ, eds). **Psychoneuroimmunology**, Lewiston: Hogrefe and Huber Publishers, pp 27 - 36.
- O'Dorisio MS, 1987. Biochemical Characteristic of Receptors for Vasoactive Intestinal Polypeptide In Nervous, Endocrine, And Immune Systems. **Fed. Proc.** **46**: 192.
- Ohgo S, et al, 1991. Stimulation by Interleukin-1 (IL-1) of the Release of Rat Corticotropin Releasing Factor (CRF) Which is Independent of the Cholinergic Mechanism, from superused Rat Hypothalamo-Neurohypophysial Complexes, **Brain Research** **550**: 213 - 219.
- Ottoway CA and Greenberg GR, 1984. Interaction of Vasoactive Intestinal Peptide with Mouse Lymphocyte; Specific Binding and The Modulation of Mitogen Responsis. **J of Immunology** **132(1)** : 417 - 423.
- Palfai Tibor, Jankiewicz Henry, 1991. **Drug and Human Behavior**. Syracuse University. Wm.C. Brown Publisher, pp 358.
- Pindborg JJ, 1980. **Oral Cancer and Precancer**, John Wriqth and Sons Ltd, Bristol.
- Pinel JPJ, 1993. **Biopsychology**, 2nd edition. Boston: Allyn and Bacon, pp 589 - 593
- Playfair JHL, 1992. **Immunology at a Glance**, Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp 1 - 2, 4, 4 - 11, 16 - 17, 22 - 23.
- Plotnikoff NP and Murgu AJ, 1985. Enkephalins Immunomodulator, **Fed Proc**, **44(1)** : 118 - 122.
- Pomerleau OF, Pomerleau Cs, 1990. Behavioural studies in human : Anxiety, stress and smoking, Ciba Faund. **Symp** **152**:225 - 235.
- Pomerleau CS, Pomerleau OF, McPhee K, etall. 1990. Discordance of physiological and biochemical response to smoking and to psychological stress. **British Journal of Addiction** **85**, 1309 - 1316.

- Pomerleau OF, 1992. Nicotine and the central nervous system : Biobehavioral effects of cigarettes smoking. **Am J Med 93 (Suppl A) : 2S - 7S.**
- Repace J and Lowrey A, 1980. Indoor Air Pollution. **Tobacco Smoke and Public Health Science Vol 202**, pp 464 - 472
- Riley V, 1981. : Psychoneuroendocrine Influences on Immunocompetence and Neoplasia. **Science, 212, 5th June : 1100 - 1109.**
- Roem Soedoko dan Asmino, 1987. **Dampak merokok terhadap kesehatan dan kehidupan.**
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 1990. **Immunology**, Second Edition Churchill Livingstone, Gower Medical Publishing 9.2 - 9,12.
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK, 1992. **Immunology**, Hongkong : Mandarin Offset, 3,1 - 3,8 ; 5,1 - 5,8 ; 8,1 - 8,9 ; 10,1 - 10,11
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK, 1993. **Immunology**, third edition, Churchill Livingstone, Gower Medical Publishing, 8.1-8.115.
- Roitt IM, 1994. **Essential Immunology**, eight edition, Oxford Blackwell Scientific Publication, 5 - 20.
- Rogmanani S, 1994. T_H1 dan T_H2 subset of $CD_4 + T$ Lymphocytes, Scientific American, **Science and Medicine, May - June. 68 - 71**
- Sandi C, Borrell J and Guaza C. 1992. Behavioral Neuroendocrine, and Immunological Outcomes of Escapable or Inescapable Shocks, **Physiol Behav. 51 (3); 651 - 656.**
- Schluger S, 1990. **Etiology of Inflammatory Periodontal Disease in Periodontal Deseasis**, Lea and Febriger Philadelphia London. pp 90 - 116.
- Serrano Mar, Curi R, Bilings MP, William JF and Newsholme EA, 1993. Effects of Glucocorticoid on Lymphocyte Metabolism. **Am J Physiol. 264(27) : 24 - 28**

- Schleifer SJ, and Keller SE, 1992. Stressful Events, Depressive Disorders, and Immunity. In (Schmoll HJ, eds). **Psychoneuroimmunology**, Lewiston: Hogrefe and Huber Publishers. pp 91 - 99.
- Shavit Y, 1991. Stress Induced Immune Modulation in Animals : Opiate and Endogenous opioid Peptide, Stress, Immunity, and Cancer In (Ader R, Felten DL, Cohen N, eds). **Psychoneuroimmunology**, New York; Boston. Academic Press. Inc. pp 789 - 804.
- Sheahan SL, Garrity TF, 1992. Stress and tobacco **Addiction Journal of The American Academy of Nurse Practitioner Vol. 4 Number 3, July - September.**
- Sigal LH, 1994. **Immunology and Inflanation Basic Mechanisms and Clinical Consequences**, 470 - 471.
- Sigal LH and Ron Y, 1994. **Immunology and Inflanation** New York : McGraw - Hill, Inc. pp 465 - 494.
- Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW, 1992. The Tress Response and The Regulation of Inflammatory Disease, **Ann-Intern-Med** 15; 117 (10); 854 - 66.
- Stites DP, Stobo JD, Well JW, 1987. **Basic and Clinical Immunology**, 6th edition, California : Appleton and Lange, 65 - 95 ; 241 - 303.
- Stites DP, Terr AI, 1991. **Basic and Clinical Immunology**, seven edition, Lange Medical Book, Prentice-Hall International Inc, 61
- Stites DP, Terr AI, Parsllow TG, 1994. **Basic and Clinical Immunology**, 8th edition, London : Prentice-Hall International pp 22 - 29 ; 40 - 49 ; 58 - 123 ; 137 - 142.
- Sulianti Suroso J, 1984. **Merokok dan kesehatan di Indonesia** pada Lokakarya Merokok dan Kesehatan, Jakarta, September.
- Subowo, 1993. **Imunobiologi**. Cetakan I Bandung, Penerbit Angkasa. Hal 57.

- Taylor SE, 1996. Psychoimmunology AIDS, Cancer and Arthritis In (Taylor SE.ED) **Health Psychology**, 2nd Ed. New York, Toronto: McGraw Hill. pp 474 - 483.
- Terr AI, 1991. Mechanism of Inflammation, In **Basic Human Immunology**, first edition, Prentice-Hall International, Inc , 131 - 140.
- Tizard IR, 1995. **Immunology An Introduction**, Fourth. Edition. Saunders College Publishing Harcourt Brale College Publishers, pp 156 - 162, 246 - 247.
- Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, 1985. **Human Psychology**, 4th edition, New York : McGraw-Hill Book.Co, 147 - 254, 600 - 626.
- Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, 1990. **Human Psychology**, 4th edition, New York : McGraw-Hill Book.Co, pp21 - 8 ; 655 - 599.
- Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, 1994. **Human Physiology** 6th edition, New York. Mc-Graw HillBook Co, pp 751 - 754.
- Vigas M, Jezova D, 1996. Activation of the neuroendocrine System during Changes in Homeostasis during Stress Conditions. **British-Lek-Listy-Feb: 97(2):** 63-71.
- Viru A, 1985. **Hormones in Muscular Activity** (Volume 1 dan 2). Florida: CRC, Press. Inc. pp 1 - 59.
- White Side TL, 1994. Cytokine measurments and Interpretation of Cytokine Assays in Human Desease, **Journal of Clinical Immunology**, Vol 14 No.6. pp. 327 - 337.
- Widodo J Pudjirahardjo, dkk 1993. **Metode Penelitian dan Statistik Terapan.**
- Wilson JD and Foster DW 1992. **Textbook of Endocrinology**. 8th edition Philadelphia: WB Saunders Co.p 135 - 219.
- Yasuda N, Yasuda Y, 1985. Biological and Immunological Studies of Bovine Hypothalamic Corticotropin Releasing Factor, **Federation Proceedings. Vol 44** : 185 - 188

Young EA, Akil A, 1985. Corticotropin Releasing Factor Stimulation of Adrenocorticotropin and beta Endorphine Release Effect of Acute and Chronic Stress, **Endocrinology**, **117** : 23 - 30

Zhang CL and Popp FA, 1994. Log-Normal Distribution of Physiological Parameter and The Coherence of Biological System. **Med-Hyphoteses** **July.43(1)** ; 11 - 16.

Lampiran 1.1 Data Variabel Tergantung

	nbt	komp1	lyt	lyo	l_2	l_4	inf_g	tnf_a	kortisol	kel	kel1	kel2	kel3	kel4	kel5
1	.2300	.1423	1.7100	1.8400	.2960	.3155	.2820	.2180	3.0400	1	1	1	0	0	0
2	.1300	.1408	1.4700	1.6800	.2460	.3675	.3180	.3480	3.9600	1	1	1	0	0	0
3	.1700	.1365	1.5300	1.4800	.3130	.3540	.2496	.2580	3.8600	1	1	1	0	0	0
4	.1600	.1398	1.5200	1.5100	.2730	.3435	.3330	.3800	3.0400	1	1	1	0	0	0
5	.2400	.1437	2.0100	1.7900	.2880	.3050	.2930	.2370	3.5400	1	1	1	0	0	0
6	.1500	.1433	1.5100	1.4200	.3010	.3420	.2950	.2810	3.8600	1	1	1	0	0	0
7	.2500	.1405	1.4800	1.7000	.2730	.3044	.2848	.2760	4.1900	1	1	1	0	0	0
8	.2700	.1360	1.5200	1.3200	.2800	.3572	.2355	.2820	3.3100	1	1	1	0	0	0
9	.2600	.1190	1.3300	1.9400	.3100	.3950	.2630	.3180	4.0600	1	1	1	0	0	0
10	.0300	.0742	1.0600	1.0800	.1550	.2223	.2365	.2540	3.9670	2	0	0	1	1	0
11	.0200	.0740	1.1600	1.1100	.1820	.2870	.2354	.2460	5.6320	2	0	0	1	1	0
12	.0400	.0727	1.1000	1.1200	.1840	.2145	.2387	.2280	5.5300	2	0	0	1	1	0
13	.0400	.0920	1.1700	1.2000	.2280	.2674	.2414	.2100	5.4660	2	0	0	1	1	0
14	.0500	.0753	1.0900	.9800	.1480	.2720	.2332	.2470	5.4080	2	0	0	1	1	0
15	.0400	.0945	1.0400	1.1500	.1980	.2997	.2400	.2310	4.9194	2	0	0	1	1	0
16	.0500	.0755	1.0200	1.1300	.2080	.2765	.2500	.2450	4.5702	2	0	0	1	1	0
17	.0400	.0713	.9900	1.1400	.1470	.2987	.2050	.2520	6.0720	2	0	0	1	1	0
18	.0400	.0900	1.1900	1.2100	.1500	.2812	.2038	.2110	5.7960	2	0	0	1	1	0
19	.0500	.0760	1.0500	.8300	.1820	.2432	.2626	.2820	6.3480	3	2	0	2	0	1
20	.0700	.0802	1.0500	1.0700	.1670	.2940	.2544	.2660	5.9900	3	2	0	2	0	1
21	.0400	.0785	1.1800	1.1400	.1900	.2046	.2447	.2350	7.1760	3	2	0	2	0	1
22	.0700	.0763	.7800	1.2100	.1970	.2752	.2613	.2540	7.2880	3	2	0	2	0	1
23	.0500	.0775	.5400	.7300	.2310	.2629	.2387	.2530	6.8200	3	2	0	2	0	1
24	.0500	.0851	1.0900	1.1400	.1760	.2534	.2030	.2210	6.0700	3	2	0	2	0	1
25	.0600	.0727	.9100	1.1800	.1440	.2783	.2232	.2620	7.1220	3	2	0	2	0	1
26	.0400	.0800	1.6400	1.3700	.1630	.2472	.2360	.2350	7.5320	3	2	0	2	0	1
27	.0500	.0988	1.0900	.8300	.2040	.2948	.2184	.2230	7.5080	3	2	0	2	0	1
28	.0400	.0710	.9020	.9000	.1580	.1830	.2360	.2170	8.2800	4	0	2	0	2	2
29	.0300	.0677	.7800	.8200	.1410	.1770	.2270	.1640	7.7820	4	0	2	0	2	2
30	.0100	.0767	.7010	.9010	.1380	.2060	.2060	.2320	7.2045	4	0	2	0	2	2
31	.0400	.0792	.8900	.9100	.1360	.2090	.2090	.2150	8.2100	4	0	2	0	2	2
32	.0300	.0727	.8710	.8600	.1430	.2080	.2080	.2160	7.3150	4	0	2	0	2	2
33	.0100	.0685	.6700	.8800	.1180	.1950	.1950	.2030	7.8240	4	0	2	0	2	2
34	.0200	.0693	.7810	.8700	.1130	.2290	.2290	.2320	7.7300	4	0	2	0	2	2
35	.0300	.0757	.8000	.9600	.1520	.2930	.2110	.1910	8.9400	4	0	2	0	2	2
36	.0100	.0740	.8700	.7000	.1220	.1845	.2240	.1540	9.9360	4	0	2	0	2	2
37	.1550	.1550	1.6100	1.7800	.2560	.3055	.2920	.2100	3.2000	5	0	0	0	0	0
38	.2600	.1325	1.5700	1.7200	.2850	.3775	.3080	.3500	3.8000	5	0	0	0	0	0
39	.1650	.1300	1.4250	1.5000	.3030	.3640	.2596	.2600	3.9060	5	0	0	0	0	0
40	.2200	.1325	1.6500	1.4500	.2800	.3325	.3196	.3700	3.0250	5	0	0	0	0	0
41	.2500	.1400	2.0000	1.7200	.2790	.3150	.2905	.2300	3.4400	5	0	0	0	0	0
42	.2400	.1380	1.4100	1.4350	.3155	.3375	.2974	.2900	3.9000	5	0	0	0	0	0
43	.1500	.1475	1.4500	1.6900	.2800	.3140	.2715	.2780	4.1800	5	0	0	0	0	0
44	.2650	.1425	1.5500	1.3400	.2825	.3770	.2300	.2920	3.2950	5	0	0	0	0	0
45	.1600	.1220	1.3000	1.9200	.3025	.3696	.2685	.3000	4.0500	5	0	0	0	0	0

Lampiran 1.2 Hasil Uji homogenitas kelompok kontrol 1 dan 2

t-tests for independent samples of KELOMPOK

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
NBT				
KONTROL 1	9	.2067	.054	.018
KONTROL 2	9	.2072	.049	.016

Mean Difference = -.0006

Levene's Test for Equality of Variances: F= .299 P= .592

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-.02	16	.982	.024	(-.052, .051)
Unequal	-.02	15.87	.982	.024	(-.052, .051)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
KOMPL				
KONTROL 1	9	.1380	.008	.003
KONTROL 2	9	.1378	.010	.003

Mean Difference = .0002

Levene's Test for Equality of Variances: F= .953 P= .343

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.05	16	.960	.004	(-.009, .009)
Unequal	.05	15.01	.960	.004	(-.009, .009)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
LYT				
KONTROL 1	9	1.5644	.193	.064
KONTROL 2	9	1.5517	.201	.067

Mean Difference = .0128

Levene's Test for Equality of Variances: F= .013 P= .912

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.14	16	.892	.093	(-.184, .210)
Unequal	.14	15.97	.892	.093	(-.184, .210)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
LYB				
KONTROL 1	9	1.6311	.209	.070
KONTROL 2	9	1.6172	.192	.064

Mean Difference = .0139

Levene's Test for Equality of Variances: F= .076 P= .787

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.15	16	.885	.095	(-.187, .215)
Unequal	.15	15.89	.885	.095	(-.187, .215)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
IL_2				
KONTROL 1	9	.2867	.021	.007
KONTROL 2	9	.2871	.018	.006

Mean Difference = -.0004

Levene's Test for Equality of Variances: F= .393 P= .540

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-.04	16	.967	.009	(-.020, .019)
Unequal	-.04	15.45	.967	.009	(-.020, .019)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
IL_4				
KONTROL 1	9	.3427	.030	.010
KONTROL 2	9	.3436	.029	.010

Mean Difference = -.0009

Levene's Test for Equality of Variances: F= .099 P= .757

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-.07	16	.947	.014	(-.030, .029)
Unequal	-.07	15.97	.947	.014	(-.030, .029)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
IFN_G				
KONTROL 1	9	.2838	.031	.010
KONTROL 2	9	.2819	.027	.009

Mean Difference = .0019

Levene's Test for Equality of Variances: F= .038 P= .848

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.14	16	.894	.014	(-.027, .031)
Unequal	.14	15.75	.894	.014	(-.027, .031)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
TNF_A				
KONTROL 1	9	.2887	.052	.017
KONTROL 2	9	.2867	.051	.017

Mean Difference = .0020

Levene's Test for Equality of Variances: F= .029 P= .866

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.08	16	.936	.024	(-.050, .054)
Unequal	.08	16.00	.936	.024	(-.050, .054)

t-tests for independent samples of KONTROL

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
KORTISOL				
KONTROL 1	9	3.6511	.435	.145
KONTROL 2	9	3.6440	.411	.137

Mean Difference = .0071

Levene's Test for Equality of Variances: F= .026 P= .873

t-test for Equality of Means 95%

Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.04	16	.972	.200	(-.416, .430)
Unequal	.04	15.95	.972	.200	(-.416, .430)

Lampiran 1.3 Hasil uji keempat kelompok perlakuan terhadap variabel tergantung

EFFECT .. KELOMPOK

Multivariate Tests of Significance (S = 3, M = 2 1/2, N = 11)

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	2.27566	9.07603	27.00	78.00	.000
Hotellings	63.57876	53.37476	27.00	68.00	.000
Wilks	.00172	20.53370	27.00	70.73	.000
Roys	.98325				

EFFECT .. KELOMPOK (Cont.)

Univariate F-tests with (3,32) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
NBT	.19376	.02591	.06459	.00081	79.76558	.000
KOMPL	.02483	.00175	.00828	.00005	151.08477	.000
LYT	2.58597	.85210	.86199	.02663	32.37140	.000
LYB	2.78688	.71962	.92896	.02249	41.30875	.000
IL_2	.11108	.01771	.03703	.00055	66.91269	.000
IL_4	.08125	.03127	.02708	.00098	27.71218	.000
TNF_A	.03404	.03355	.01135	.00105	10.82433	.000
TNF_G	.02286	.01456	.00762	.00045	16.74902	.000
CORTISOL	102.44542	13.71012	34.14847	.42844	79.70400	.000

Lampiran 1.4 Hasil uji kelompok kontrol dan kelompok asap

rokok

EFFECT .. KEL_1

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 3 1/2, N = 3)

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.99404	148.33417	9.00	8.00	.000
Hotellings	166.87594	148.33417	9.00	8.00	.000
Wilks	.00596	148.33417	9.00	8.00	.000
Roys	.99404				

Note.. F statistics are exact.

EFFECT .. KEL_1 (Cont.) (kontrol dan asap rokok)

Univariate F-tests with (1,16) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
NBT	.10580	.02400	.10580	.00150	70.53333	.000
KOMPL	.01484	.00093	.01484	.00006	254.80205	.000
LYT	2.02676	.55682	2.02676	.03480	58.23778	.000
LYB	2.13556	.50804	2.13556	.03175	67.25571	.000
IL_2	.04764	.00882	.04764	.00055	86.46090	.000
IL_4	.02965	.01380	.02965	.00086	34.37968	.000
TNF_A	.00748	.02502	.00748	.00156	4.78533	.044
TNF_G	.00941	.01103	.00941	.00069	13.64746	.002
CORTISOL	46.70289	4.38236	46.70289	.27390	170.51226	.000

Lampiran 1.5 Hasil uji kelompok kontrol dan kelompok stres

"electric foot shock"

EFFECT .. KELOMPOK (kontrol dan shol elektrik)
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 3 1/2, N = 3)

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.98413	55.13522	9.00	8.00	.000
Hotellings	62.02713	55.13522	9.00	8.00	.000
Wilks	.01587	55.13522	9.00	8.00	.000
Roys	.98413				

Note.. F statistics are exact.

EFFECT .. KELOMPOK (Cont.)(kontrol dan shok elektrik)
Univariate F-tests with (1,16) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
NBT	.12667	.02369	.12667	.00148	85.55722	.000
KOMPL	.01516	.00116	.01516	.00007	209.33106	.000
LYT	1.83361	.55441	1.83361	.03465	52.91705	.000
LYB	2.01336	.52484	2.01336	.03280	61.37759	.000
IL_2	.05336	.01063	.05336	.00066	80.31275	.000
IL_4	.02455	.01483	.02455	.00093	26.48420	.000
TNF_A	.01248	.02386	.01248	.00149	8.36946	.011
TNF_G	.01228	.00983	.01228	.00061	19.98799	.000
CORTISOL	11.68152	5.00179	11.68152	.31261	37.36751	.000

Lampiran 1.6 Hasil uji kelompok kontrol dan kelompok gabungan

EFFECT .. KEL_2

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 3 1/2, N = 3)

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.99363	138.59763	9.00	8.00	.000
Hotellings	155.92234	138.59763	9.00	8.00	.000
Wilks	.00637	138.59763	9.00	8.00	.000
Roys	.99363				

Note.. F statistics are exact.

 EFFECT .. KEL_2 (Cont.) (kontrol dan gabungan)
 Univariate F-tests with (1,16) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
NBT	.14942	.02422	.14942	.00151	98.70092	.000
KOMPL	.01915	.00059	.01915	.00004	519.60882	.000
LYT	1.00820	.33851	1.00820	.02116	47.65338	.000
LYB	1.15520	.38731	1.15520	.02421	47.72184	.000
IL_2	.10260	.00547	.10260	.00034	300.12285	.000
IL_4	.07995	.01728	.07995	.00108	74.03196	.000
TNF_A	.03328	.02785	.03328	.00174	19.12346	.000
TNF_G	.02060	.00917	.02060	.00057	35.92896	.000
CORTISOL	90.50282	7.35775	90.50282	.45986	196.80554	.000

Lampiran 1.7 Hasil uji kelompok stres "electric foot shock" dan kelompok asap rokok.

EFFECT .. KEL_3 (shok elektrik dan asap rokok)
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 3 1/2, N = 3)

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.90184	8.16700	9.00	8.00	.004
Hotellings	9.18788	8.16700	9.00	8.00	.004
Wilks	.09816	8.16700	9.00	8.00	.004
Roys	.90184				

Note.. F statistics are exact.

EFFECT .. KEL_3 (Cont.)
Univariate F-tests with (1,16) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
NBT	.00094	.00169	.00094	.00011	8.89474	.009
KOMPL	.00000	.00116	.00000	.00007	.02396	.879
LYT	.00483	.51359	.00483	.03210	.15062	.703
LYB	.00180	.33231	.00180	.02077	.08667	.772
IL_2	.00016	.01224	.00016	.00076	.21181	.652
IL_4	.00024	.01400	.00024	.00087	.27415	.608
TNF_A	.00064	.00570	.00064	.00036	1.78514	.200
TNF_G	.00019	.00538	.00019	.00034	.56515	.463
CORTISOL	11.66992	6.35237	11.66992	.39702	29.39356	.000

Lampiran 1.8 Hasil uji kelompok stres "electric foot shock" dan kelompok gabungan

EFFECT .. KEL_4 (shok elektrik dan gabungan)
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 3 1/2, N = 3)

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.89040	7.22150	9.00	8.00	.005
Hotellings	8.12419	7.22150	9.00	8.00	.005
Wilks	.10960	7.22150	9.00	8.00	.005
Roys	.89040				

Note.. F statistics are exact.

EFFECT .. KEL_4 (Cont.) (shok elektrik dan gabungan)
Univariate F-tests with (1,16) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
NBT	.00094	.00191	.00094	.00012	7.86047	.013
KOMPL	.00023	.00082	.00023	.00005	4.53122	.049
LYT	.12251	.29528	.12251	.01845	6.63849	.020
LYB	.11842	.21158	.11842	.01322	8.95536	.009
IL_2	.00798	.00889	.00798	.00056	14.35979	.002
IL_4	.01589	.01748	.01589	.00109	14.54672	.002
TNF_A	.00500	.00853	.00500	.00053	9.38086	.007
TNF_G	.00107	.00352	.00107	.00022	4.86364	.042
CORTISOL	37.15479	9.32775	37.15479	.58298	63.73201	.000

Lampiran 1.9 Hasil uji kelompok asap rokok dengan kelompok gabungan

EFFECT .. KEL_5 (asap rokok dan gabungan)
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 3 1/2, N = 3)

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	.86809	5.84980	9.00	8.00	.010
Hotellings	6.58102	5.84980	9.00	8.00	.010
Wilks	.13191	5.84980	9.00	8.00	.010
Roys	.86809				

Note.. F statistics are exact.

EFFECT .. KEL_5 (Cont.) (asap rokok dan gabungan)
Univariate F-tests with (1,16) D. F.

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
NBT	.00376	.00222	.00376	.00014	27.04000	.000
KOMPL	.00027	.00059	.00027	.00004	7.39455	.015
LYT	.17602	.29769	.17602	.01861	9.46073	.007
LYB	.14942	.19478	.14942	.01217	12.27427	.003
IL_2	.01042	.00708	.01042	.00044	23.54724	.000
IL_4	.01223	.01644	.01223	.00103	11.89770	.003
TNF_A	.00920	.00968	.00920	.00061	15.20343	.001
TNF_G	.00216	.00473	.00216	.00030	7.31936	.016
CORTISOL	7.17889	8.70833	7.17889	.54427	13.18993	.002
