

SKRIPSI

**EVALUASI PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRIH (*Piper betle L.*)
TERHADAP AKTIVITAS SISTEM KEKEBALAN
PADA MENCIT**



Oleh :

DEWI PUDJIATI ALIE

BANJARMASIN - KALSEL

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1991**

EVALUASI PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRIH (*Piper betle* L.)
TERHADAP AKTIVITAS SISTEM KEKEBALAN
PADA MENCIT

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Dokter Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

DEWI PUDJIATI ALIE

068410991

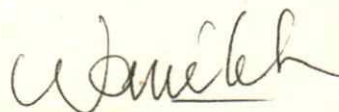
Menyetujui

Komisi Pembimbing



(Dr.drh. Sri Subekti B.S.)

Pembimbing Pertama




(drh. Nanik Sianita W.,SU.)

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar DOKTER HEWAN.

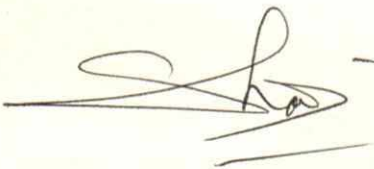
Menyetujui

Panitia Penguji



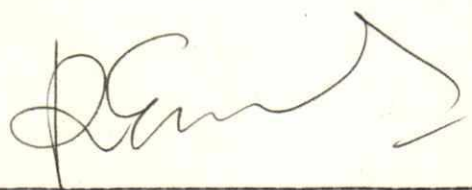
(drh. Achmad Sadik)

Ketua



(drh. Susilohadi W., SU.)

Anggota

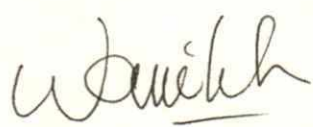


(drh. Rahayu Ernawati, M.Sc.)

Anggota



(Dr. drh. Sri Subekti B.S.)



(drh. Nanik Sianita W., SU.)

Surabaya, 25 Mei 1991

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



(Prof. Dr. Soehartojo H., M.Sc.)

EVALUASI PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SIRIH (*Piper betle* L.)
TERHADAP AKTIVITAS SISTEM KEKEBALAN
PADA MENCIT

Dewi Pudjiati Alie

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lebih lanjut pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap aktivitas sistem kekebalan pada mencit.

Digunakan sejumlah 36 ekor mencit betina strain BALB/c, berumur dua bulan dan belum pernah beranak dengan berat badan berkisar antara 20 sampai 22 g. Selama penelitian, mencit-mencit tersebut diberi pakan ayam Par G produksi P.T. Comfeed Indonesia. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap untuk uji aktivitas tanggap kebal berperantara sel dan rancangan petak terbagi untuk uji aktivitas pembentukan imunoglobulin. Masing-masing uji dibagi menjadi tiga kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor mencit yang diberi ekstrak daun sirih dengan volume 0,5 ml secara oral, sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut. Pada uji aktivitas tanggap kebal berperantara sel, masing-masing 5, 10, dan 15 hari kemudian disensitisasi dengan sel darah merah domba yang diinjeksikan secara intra dermal pada telapak kaki belakang kiri. Setelah dua hari kemudian dilakukan uji tantang (*challenge*) dengan sel darah merah domba yang diinjeksikan pada telapak kaki belakang kanan pada semua kelompok mencit perlakuan dan 24 jam kemudian dilakukan pengukuran kedua telapak kaki mencit. Pada uji aktivitas pembentukan imunoglobulin, masing-masing 24, 48, dan 72 jam kemudian diinjeksi dengan sel darah merah domba secara intra vena pada vena caudalis. Satu minggu kemudian dilakukan pengambilan darah dari sinus retro supraorbitalis mencit dan diulangi lagi pada minggu kedua dan ketiga, untuk uji HA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih secara oral menyebabkan pembentukan kekebalan seluler yang tertinggi pada perlakuan hari ke 15, juga menunjukkan peningkatan kekebalan humoral yang tertinggi pada perlakuan 48 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir dan tetap dapat dipertahankan sampai dengan minggu ketiga.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala rahmat dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Dengan rasa hormat, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tulus dan tak terhingga kepada (alm) Bapak Dr. drh. R. Bendryman Soedjoko, Ibu Dr. drh. Sri Subekti B.S. selaku pembimbing pertama dan Ibu drh. Nanik Sianita W., SU. selaku pembimbing kedua yang selalu bersedia memberikan bimbingan, saran, dan nasihat yang sangat besar artinya dalam penyusunan skripsi ini.

Demikian pula penulis mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya atas bantuan moral dan material serta kesempatan yang telah diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini.

Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga beserta staf pengajar dan karyawan, atas kesempatan, sarana, dan bantuan yang diberikan dalam melaksanakan penelitian ini.

Kepada Ayah dan Ibu terkasih, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang dalam serta tulus

atas perhatian, nasihat, dan dorongan semangat serta doa restunya selama dan sampai berakhirnya pendidikan.

Kepada saudara-saudaraku dan rekan sekalian, penulis mengucapkan terima kasih atas segala pertolongannya.

Akhirnya kepada semua pihak yang belum sempat disebutkan di atas, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas segala bantuannya.

Semoga segala amalnya mendapat imbalan dari Tuhan Yang Maha Esa. Amien.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	5
Klasifikasi, Sinonim, dan Nama daerah	5
Uraian tentang Tanaman	7
Aktivitas Sistem Kekebalan	8
Peranan Limfosit T pada Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat	11
Peranan Limfosit B pada Aktivitas Pembentukan Immunoglobulin	18
MATERI DAN METODE	23
Materi Penelitian	23
Metode Penelitian	25
Peubah yang Diamati	33
Rancangan Penelitian	34
HASIL PENELITIAN	35
Hasil Uji Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat	35
Hasil Uji Hemagglutinasi (HA) Mikrotehnik ..	39
PEMBAHASAN	45
KESIMPULAN DAN SARAN	50
RINGKASAN	51

DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku ($S_{\bar{y}}$) Selisih Penebalan Telapak Kaki Kelompok Mencit Perlakuan (dalam Satuan Milimeter)	35
2.	Notasi Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih terhadap Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat pada Mencit	38
3.	Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku ($S_{\bar{y}}$) Titer HA ($\log 2$) pada Masing-masing Kelompok Mencit Perlakuan	39
4.	Notasi Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih pada Berbagai Kelompok Mencit Perlakuan	43

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Skema Interaksi-interaksi Sistem Kekebalan	11
2.	Empat Reaksi Hipersensitivitas seperti yang Diklasifikasikan oleh Gell dan Coombs	13
3.	Tanggap Sel B terhadap Antigen	20
4.	Gambaran Pembacaan Uji HA Mikrotehnik .	33
5.	Histogram Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku ($S_{\bar{D}}$) Selisih Penebalan Telapak Kaki Mencit (mm)	36
6.	Histogram Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku ($S_{\bar{D}}$) Titer HA (log 2) pada Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan ..	40
7.	Pemberian Ekstrak Daun Sirih secara Oral	66
8.	Injeksi Sel Darah Merah Domba secara Intra Vena pada Vena Caudalis	66
9.	Pengambilan Darah melalui Sinus Retro Supraorbitalis Mencit	67
10.	Hasil Pengujian Hemagglutinasii (HA) Mikrotehnik	67
11.	<i>Challenge</i> pada Uji Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat (DTH)	68
12.	Pengukuran Penebalan Telapak Kaki Mencit dengan Mikrometer Sekrup	68
13.	Rak Kandang Pemeliharaan Hewan Percobaan	69

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Hasil Pengukuran Penebalan Telapak Kaki Kelompok Mencit Perlakuan (dalam Satuan Milimeter)	57
2. Analisis Varian F terhadap Selisih Penebalan Telapak Kaki Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan dengan Rancangan Acak Lengkap	58
3. Uji Jarak Berganda Duncan terhadap Nilai Rataan Selisih Penebalan Telapak Kaki Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan	60
4. Hasil Titer HA (log 2) pada Berbagai Kelompok Mencit Perlakuan yang Diberi Ekstrak Daun Sirih	61
5. Analisis Varian F terhadap Titer HA (log 2) pada Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan dengan Rancangan Petak Terbagi	62
6. Uji Jarak Berganda Duncan terhadap Titer HA (log 2) pada Berbagai Kelompok Mencit Perlakuan	65
7. Pemberian Ekstrak Daun Sirih secara Oral	66
8. Injeksi Sel Darah Merah Domba secara Intra Vena pada Vena Caudalis	66
9. Pengambilan Darah melalui Sinus Retro Supraorbitalis Mencit	67
10. Hasil Pengujian Hemagglutinasasi (HA) Mikrotehnik	67
11. <i>Challenge</i> pada Uji Reaksi Hipersensitivitas Tipe lambat (DTH)	68
12. Pengukuran Penebalan Telapak Kaki Mencit dengan Mikrometer Sekrup	68
13. Rak Kandang Pemeliharaan Hewan Percobaan	69

PENDAHULUAN

Latar Belakang Masalah

Pemanfaatan tanaman serta uraian-uraian tentang tanaman obat telah dikenal sejak abad-abad permulaan dan dengan nalar pengalaman digunakan untuk penyembuhan penyakit tertentu.

Pada tradisi masyarakat kita, pemakaian tanaman untuk tujuan pengobatan sudah dikenal secara luas dan sering populer dengan nama tanaman obat tradisional.

Pengobatan dengan tanaman didasarkan pada konsep totalitas. Bahan-bahan berkhasiatnya dalam bentuk kompleks dan pengobatannya bersifat keseluruhan tubuh.

Tanaman obat tradisional pada penggunaannya terutama ditujukan untuk memelihara dan meningkatkan kesehatan, mencegah dan mengobati penyakit serta memulihkan kesehatan, yang dipergunakan secara turun-temurun oleh masyarakat (Azwar, 1990).

Dewasa ini penggunaan obat tradisional Indonesia makin hari makin berkembang pesat, namun sebagian besar penggunaan dan kegunaannya masih berdasarkan tradisi, kepercayaan, dan informasi lisan maupun tulisan sehingga perlu diadakan pengembangan lebih lanjut dan pengujian pemanfaatannya dengan berdasarkan landasan ilmiah yang ada sangat dibutuhkan.

Khusus untuk upaya pengembangan tanaman obat tradisional ini, saat ini sedang dikembangkan cabang ilmu baru yang dikenal dengan nama phyto medica. Diharapkan dapat diketahui sejauh mana kandungan tanaman obat yang digunakan dapat memberikan pengaruhnya pada individu yang bersangkutan, apalagi sekarang juga telah beredar di masyarakat jamu untuk hewan buatan pabrik.

Pemilihan tanaman sebagai obat tradisional dalam pengalaman berabad-abad didasarkan pada pengamatan panca indera, antara lain: warna, bau atau aroma, rasa dan selain itu juga mudah ditanam. Dalam penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa 80 persen dari tanaman-tanaman obat termasuk familia Piperaceae, Zingiberaceae, dan Umbelliferae (Sirait, 1989).

Salah satu dari tanaman-tanaman tradisional yang dapat digunakan sebagai obat tradisional tersebut adalah sirih (*Piper betle* L.) yang termasuk familia Piperaceae.

Menurut Heyne (1981) tanaman sirih selain mudah didapat dan murah harganya juga telah dikenal oleh masyarakat luas sebagai obat bisul, obat kumur untuk menghilangkan bau mulut, dan juga untuk menghentikan perdarahan hidung dengan menyumbatkan daun sirih pada lubang hidung (Dzen dkk., 1988). Menurut Labadie (1986) daun sirih juga digunakan untuk obat luka gigit-

an serangga, peradangan, dan bisul yang diperkirakan mempunyai hubungan dengan aktivitas daun sirih terhadap sistem kekebalan tubuh. Disebutkan juga oleh Sriyono (1990) bahwa ekstrak daun sirih mempunyai pengaruh yang dapat meningkatkan fungsi sistem kekebalan.

Mengingat kegunaan-kegunaan dari daun sirih tersebut, maka penulis tertarik untuk mengetahui lebih lanjut pengaruh daun sirih tersebut terhadap sistem kekebalan tubuh.

Untuk mengevaluasinya maka perlu diadakan orientasi terhadap fakta-fakta dari sifat respon kekebalan yang timbul, yaitu terhadap respon kekebalan seluler dan respon kekebalan humoral.

Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui lebih lanjut pengaruh pemberian ekstrak daun sirih terhadap aktivitas tanggap kebal berperantara sel dan aktivitas pembentukan imunoglobulin pada mencit.

Manfaat Penelitian

Mengingat peternakan-peternakan di Indonesia sebagian besar terdapat di daerah pedesaan, demikian juga tanaman-tanaman obat tradisional termasuk tanaman sirih maka bilamana terdapat pengaruh tanaman-tanaman tersebut terhadap sistem kekebalan tubuh, ini akan

dapat membantu para peternak di pedesaan yang sebagian masih cukup sulit untuk mendapatkan obat-obatan modern.

Diharapkan dari penelitian pada hewan percobaan mencit ini, dapat selanjutnya diaplikasikan pada hewan ternak setelah melalui penelitian lebih lanjut atau setidak-tidaknya saat ini dapat dianjurkan penggunaannya pada hewan ternak dalam batas-batas kewajaran dengan tujuan penanggulangan penyakit.

Hipotesis

Adanya pengaruh pemberian ekstrak daun sirih ini terhadap sistem kekebalan tubuh dapat dilihat melalui uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH) untuk kekebalan seluler dan uji hemagglutinasi (HA) untuk kekebalan humoral. Dalam hipotesis pada respon kekebalan seluler diharapkan terjadi perbedaan reaksi hipersensitivitas tipe lambat di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan. Dalam hipotesis pada respon kekebalan humoral diharapkan terjadi perbedaan aktivitas pembentukan imunoglobulin di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan.

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Tentang Tanaman Sirih (*Piper betle* L.)

Klasifikasi (Heyne, 1987)

Divisi	:	Spermatophyta
Anak divisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Anak kelas	:	Archichlamydae
Bangsa	:	Piperales
Suku	:	Piperaceae
Marga	:	Piper
Jenis	:	<i>Piper betle</i> L.
Varietas	:	<i>Piper betle</i> L. var. Jawa

Sinonim (Heyne, 1987)

1. *Piper betle* L.
2. *Chavica auriculata* Miq
3. *Chavica betle* Miq

Nama Daerah (Anonymous, 1980; Heyne, 1987)

Sumatera	:	Furukuwe, purokuwo (Enggano), ranub (Aceh), belo (Batak Karo), demban (Batak Toba), sirih, suruh, sireh (Palembang, Minangkabau), jabai (Lampung).
Kalimantan	:	Uwit (Dayak), buyu (Bulungan), uduhsifa (Kenya),

- sirih (Sampit), urusipa (Seputan).
- Sulawesi : Ganjang, gapura (Bugis), bolu (parigi), komba (selayar), lalama, sangi (Talaud), dontile, biu (gorontalo).
- Nusa Tenggara: Nahi (Bima), kuta (sumba), mota (Flores), orengi (Ende), mamef, furuk (Timor).
- Maluku : Papek, raunge, rambika (Alfuru), ani-ani (Hok), garmo (Buru), amu (Ambon), gies, bido (Halmahera), gamo, dalu (Buru), ain, nein, kakina, kamu (Seram).
- Irian : Reman (Wendebi), manaw (Mamiki), namuera (Saber), eouwon (Armahi), afo (Sentani), wangi (Sawe), freedor (Awija), dedami (Marind).
- Jawa : Seureuh (Sunda), sedah, suruh (Jawa), sere (Madura).
- Bali : Base, sedah.

Uraian tentang Tanaman

Tanaman ini dibudidayakan oleh suku-suku di seluruh Indonesia. Di Jawa tanaman ini akan tumbuh dengan baik pada ketinggian 200 sampai dengan 1000 kaki di atas permukaan laut.

Merupakan tanaman memanjat yang biasanya ditanam di halaman rumah atau pekarangan dan dapat berfungsi sebagai pohon pelindung dari pohon dadap, kelor, kayu kuda, dan randu.

Daunnya berbentuk bulat telur atau jantung dan rasanya seperti rempah-rempah, sedikit pedas dan tajam. Tanaman ini memberikan daun pertama yang dapat dimanfaatkan mulai pada umur satu tahun dan terus memberikan hasil selama 10 sampai dengan 12 tahun.

Ditemukan beberapa varietas tanaman sirih, antara lain:

- Sirih Jawa (yang terbanyak); daun lebih lembek, berwarna hijau rumput, dan kurang tajam.
- Sirih Banda; daun hijau tua, lebar-lebar, lebih tajam dan lebih pedas.
- Sirih cengkeh; daun kuning, kecil-kecil, tajam, dan rasanya seperti cengkeh.
- Sirih kuning; daun kuning dan kurang tajam.
- Sirih hitam; daun kehitam-hitaman dan sangat tajam.

Daun sirih banyak digunakan sebagai obat tradisional, antara lain Nyonya Kloppenburg menyarankan agar ekstrak daun sirih digunakan untuk berkumur pada mulut yang bengkak, menghentikan perdarahan gigi, membersihkan luka-luka, dan mengobati gatal-gatal serta bisul. Rebusan daun sirih dapat untuk mengobati suara parau dan batuk. Penggunaan daun sirih tersebut, antara lain disebabkan oleh adanya minyak atsiri yang kadarnya kurang lebih sebesar 0,6 sampai dengan 0,9 persen. Ternyata sepertiga dari minyak atsiri tersebut terdiri dari fenol dan sebagian besar lainnya adalah *chavicol*. *Chavicol* ini memberikan bau khas sirih dan memiliki daya pembunuh bakteri sebesar lima kali daripada fenol.

Zat-zat yang terkandung dalam daun sirih ini, antara lain: minyak atsiri, pati, gula, diatase, dan alkaloid (Mardisiswojo dan Radjakmangunsudarso, 1971; Anonymous, 1985; dan Heyne, 1987).

B. Tinjauan Tentang Imunologi

Aktivitas Sistem Kekebalan Tubuh

Di dalam tubuh manusia dan hewan terdapat suatu sistem yang disebut limforetikuler, yaitu suatu sistem yang melaksanakan fungsi kekebalan tubuh (Tizard, 1988).

Bila antigen memasuki tubuh, pertama-tama antigen tersebut harus dijerat sedemikian rupa sehingga dapat diketahui sebagai bahan asing dan informasi ini dikirimkan ke sistem pembentuk antibodi atau ke sistem tanggap kebal berperantara sel. Sistem ini harus segera menanggapi dengan membentuk antibodi khusus dan/atau sel yang mampu menyingkirkan antigen tersebut.

Antigen ditangkap, diolah dan akhirnya disingkirkan oleh makrofag sedangkan sel peka antigen yang terdapat pada permulaan tanggap primer dan sel memori yang akan memulai tanggap sekunder maupun sel efektor dalam tanggap yang berperantara sel, dikenal sebagai limfosit kecil dan sel penghasil antibodi berasal dari limfosit dikenal sebagai sel plasma (Tizard, 1988).

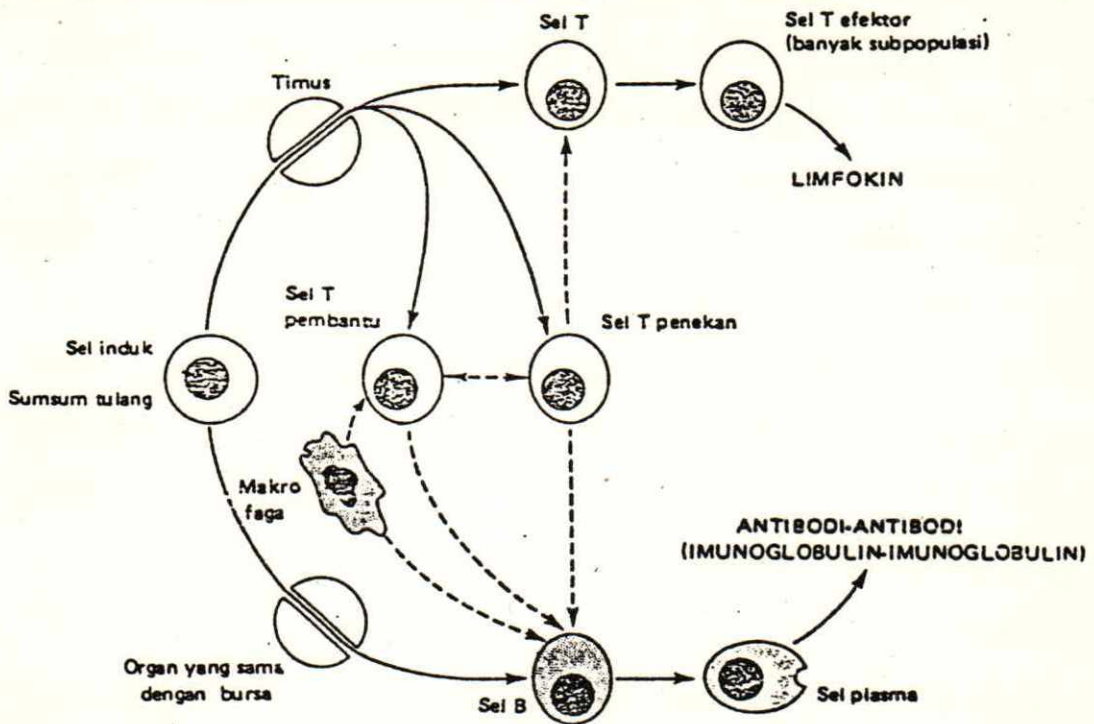
Seperti halnya sistem hormonal maupun sistem saraf tubuh, sistem kekebalan tubuh juga nampak berperan sebagai pengatur daya tahan organisme secara menyeluruh. Apabila sinyal berada di bawah batas nilai ambang maka sistem tersebut kurang atau tidak bereaksi dan sebaliknya apabila sinyal-sinyal terlalu kuat akibat mikroorganisme atau antigen yang masuk terlalu ganas maka serangkaian reaksi akan timbul dan mengakibatkan ketidakseimbangan sistem-sistem dalam tubuh (Bendryman, 1988). Ada sejumlah faktor yang mempengaruhi mekanisme kekebalan tubuh, yaitu: faktor genetik,

umur, metabolik, lingkungan, anatomi, fisiologi, dan mikrobial (Bellanti, 1985).

Sistem kekebalan tubuh yang mendapat rangsangan antigen akan menimbulkan respon kekebalan yang secara garis besar dibedakan menjadi dua, yaitu: respon kekebalan non spesifik dan respon kekebalan spesifik. Pada respon kekebalan non spesifik, mekanisme pertahanan tubuhnya dapat berfungsi sewaktu-waktu dan tidak ditujukan khusus untuk antigen asing tertentu, misalnya pada proses fagositosis dan peradangan sedangkan respon kekebalan spesifik, mekanisme pertahanan tubuhnya harus dirangsang terlebih dahulu dan sifat pertahanannya amat khusus terhadap antigen asing yang menginduksinya (Bellanti, 1985; Indah dkk., 1987).

Respon kekebalan spesifik terdiri dari respon kekebalan seluler dan respon kekebalan humoral (Roitt, 1985). Dalam respon kekebalan dikenal dua jenis limfosit yang berperan, yaitu: limfosit T dan limfosit B, keduanya saling mendukung untuk menimbulkan respon kekebalan (Marchalonis, 1978).

Limfosit T yang berperan dalam kekebalan seluler, perkembangannya dipengaruhi oleh timus sedangkan limfosit B yang perkembangannya dipengaruhi oleh sumsum tulang atau *Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT)*, berperan dalam kekebalan humoral (Unanue, 1978).



Gambar 1. Skema Interaksi-interaksi Sistem Kekebalan (Jawetz *et al.*, 1984)

Peranan Limfosit T pada Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat

Limfosit T yang berperan dalam kekebalan seluler ini dipengaruhi oleh timus melalui hormon-hormon yang dikeluarkannya, antara lain: timosin atau timopoitin (Hokama dan Nakamura, 1982; Roitt, 1985).

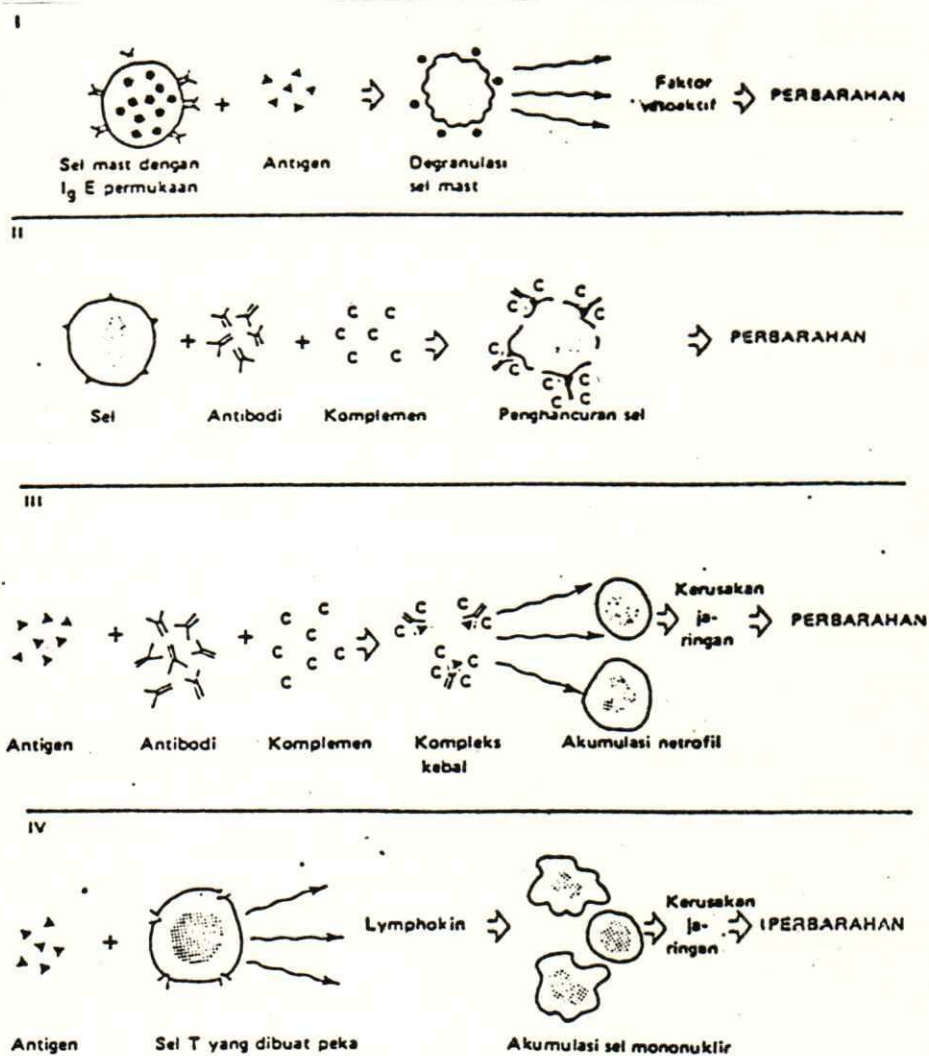
Timosin bekerja pada sel-sel induk dari sumsum tulang untuk membuatnya menjadi matang dan akan berdiferensiasi menjadi sel T yang berumur panjang, yaitu beberapa bulan atau beberapa tahun (Roitt, 1985; Bellanti, 1985).

Diferensiasi sel T mencakup berbagai tahap di antaranya adalah pembentukan petanda permukaan, perubahan antigen permukaan, dan sifat-sifat fungsional limfosit. Limfosit T berdiferensiasi menjadi limfosit T penolong, limfosit T penekan, limfosit T sitotoksik, limfosit T memori, dan limfosit T hipersensitivitas tipe lambat, yang kesemuanya itu ikut berfungsi dalam respon kekebalan seluler (Bellanti, 1985; Kresno, 1988).

Limfosit T yang berinteraksi dengan antigen yang dibawa oleh makrofag pada permukaannya, dapat menghancurkan antigen asing tersebut secara langsung atau secara tidak langsung dengan melepaskan limfokin.

Interaksi antara limfosit T dengan makrofag dan terlibatnya sel-sel polimorfonuklear akan merintis terjadinya reaksi hipersensitivitas tipe lambat (Bellanti, 1985; Jawetz *et al.*, 1984).

Reaksi hipersensitivitas timbul pada individu yang daya reaksinya terhadap suatu antigen yang sama atau hampir sama telah mengalami perubahan dan dapat menghasilkan sejumlah reaksi-reaksi abnormal. Reaksi hipersensitivitas ini ada dua macam, yaitu reaksi dengan perantaraan antibodi atau jenis segera dan reaksi dengan perantaraan sel atau jenis lambat (Jawetz *et al.*, 1984; Hokama dan Nakamura, 1982).



Gambar 2. Empat Reaksi Hipersensitivitas seperti yang Diklasifikasikan oleh Gell dan Coombs (Tizard, 1988)

Menurut Gell dan Coombs (1963) reaksi hipersensitivitas dibagi menjadi empat tipe, yaitu: hipersensitivitas tipe I atau hipersensitivitas jenis anafilaktik, hipersensitivitas tipe II atau hipersensitivitas

jenis sitotoksik, hipersensitivitas tipe III atau hipersensitivitas perantara kompleks, dan hipersensitivitas tipe IV atau hipersensitivitas perantara sel atau hipersensitivitas tipe lambat (Mackness, 1978; Wells, 1978; Hokama dan Nakamura, 1982; Roitt, 1985).

Hipersensitivitas Tipe I atau Hipersensitivitas Jenis Anafilaktik

Reaksi ini terjadi akibat adanya interaksi antara antigen dan imunoglobulin E spesifik yang terikat pada membran sel mast atau sel basofil. Imunoglobulin E spesifik yang terbentuk setelah masuknya antigen ke dalam tubuh, bertanggung jawab terhadap kelainan yang timbul. Setelah mengalami fase sensitisasi, masuknya antigen yang kedua kali akan berikatan dengan imunoglobulin E yang telah berikatan dengan dinding sel mast atau sel basofil sehingga akan dilepaskan beberapa mediator kimia yang terdapat dalam granula sel mast dan salah satu di antaranya adalah histamin (Jawetz *et al.*, 1984; Effendi dkk., 1988).

Pelepasan histamin menyebabkan vasodilatasi lokal, peningkatan permeabilitas kapiler, dan kontraksi otot polos. Peningkatan permeabilitas kapiler dan dilatasi kapiler akan menyebabkan timbulnya reaksi eritema, edema, dan urtikaria pada tempat yang kontak

dengan antigen. Reaksi ini timbul secara cepat dan mencapai intensitas maksimum dalam waktu 30 menit, setelah itu cenderung menjadi kabur dan akan menghilang dalam beberapa jam (Tizard, 1988).

Hipersensitivitas Tipe II atau Hipersensitivitas Jenis Sitotoksik

Reaksi ini terjadi karena adanya interaksi antara imunoglobulin G atau M dengan suatu antigen yang berada pada permukaan sel atau membran jaringan tubuh. Membran sel menjadi rusak dan sel akan lisis serta mati, kemudian sel-sel yang mati akan ditiadakan oleh sel fagosit dengan cara perlekatan melalui imunoglobulin G atau dilisis oleh kegiatan sistem komplemen lengkap (Roitt, 1985).

Antigen pada permukaan sel yang bergabung dengan antibodi dapat melakukan opsonisasi dan fagositosis tanpa komplemen, selain itu dapat mempermudah serangan sel T dalam melakukan fungsi sitotoksik dengan perantaraan komplemen (Jawetz *et al.*, 1984).

Hipersensitivitas Tipe III atau Hipersensitivitas Perantaraan Kompleks

Hipersensitivitas ini diperantarai oleh antigen antibodi kompleks dan timbul sebagai manifestasi terbentuknya kompleks kebal serta terjadinya aktivasi

komplemen setelah kompleks kebal membentuk deposit pada jaringan tubuh, misalnya pada ginjal, persendian, dan dinding arteri. Hal ini mengakibatkan timbulnya reaksi inflamasi dan kerusakan jaringan di tempat deposit (Roitt, 1985).

Salah satu contoh dari reaksi hipersensitivitas ini adalah reaksi arthus, yang dapat timbul bila antigen disuntikkan secara sub kutan pada seekor hewan yang memiliki antibodi yang bersirkulasi dan dapat mengen-
dapkan antigen tersebut. Selanjutnya akan terjadi reaksi peradangan akut dalam beberapa jam pada tempat suntikan yang dimulai dari eritema, edema kemudian terjadi hemoragi lokal dan trombosis yang bila parah akan memuncak pada nekrosis (Tizard, 1988).

**Hipersensitivitas Tipe IV atau Hipersensitivitas Peran-
taraan Sel atau Hipersensitivitas Tipe Lambat (*Delayed
Type Hypersensitivity = DTH*)**

Reaksi hipersensitivitas tipe lambat terjadi se-
bagai akibat adanya interaksi antara antigen yang
diinjeksikan dan limfosit T yang telah disensitisasi.
Bila antigen tertentu diinjeksikan secara intra dermal
pada hewan yang telah disensitisasi maka reaksi perba-
rahan akan timbul setelah beberapa jam pada tempat
injeksi, misalnya pada reaksi tuberkulin yang merupakan

reaksi khusus imunologis yang diperantarai oleh limfosit T.

Diperkirakan bahwa limfosit T yang peka di dalam sirkulasi bertemu dengan antigen yang diinjeksikan, kemudian limfosit T tersebut akan menanggapi dengan cara memanggil limfosit T yang lain, mengadakan proliferasi serta mengeluarkan limfokin.

Diduga makrofag juga berakumulasi di tempat itu karena adanya pengeluaran faktor kemotatik makrofag dan selanjutnya migrasi atau perpindahannya dari tempat tersebut akan dicegah oleh faktor penghambat migrasi. Pada akhirnya makrofag akan menelan dan menghancurkan antigen tersebut dengan tujuan menghilangkan rangsangan untuk memproduksi limfokin lebih lanjut dan memungkinkan jaringan kembali ke keadaan normal (Dupuy dan Good, 1970; Wahl, *et al.*, 1975; Wing dan Remington, 1978; dan Bach, 1982).

Hipersensitivitas tipe lambat berhubungan erat dengan kekebalan seluler yang juga melibatkan sel T sebagai komponen utamanya serta dapat dianggap sebagai contoh *in vivo* untuk reaksi kekebalan berperantara sel (Wing dan Remington, 1978; Jawetz *et al.*, 1984).

Reaksi hipersensitivitas tipe lambat mulai timbul beberapa jam setelah kontak dengan antigen dan mencapai intensitas maksimum kurang lebih 24 sampai dengan 48

jam setelah injeksi yang ditandai dengan eritema, edema, dan indurasi karena adanya infiltrasi seluler.

Pada reaksi hipersensitivitas yang menggunakan sarana antibodi, dapat ditransfer melalui serum tetapi hipersensitivitas tipe lambat atau berperantara sel ini hanya bisa dipindahkan oleh sel limfoid dan tidak dapat dipindahkan oleh serum (Mackaness, 1978; Bach, 1982; Hokama dan Nakamura, 1982; Jawetz *et al.*, 1984).

Peranan Limfosit B pada Aktivitas Pembentukan Imunoglobulin

Limfosit B di bawah pengaruh rangsangan antigen akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang dapat melepaskan antibodi ke dalam darah (Ganong, 1983).

Antibodi adalah glikoprotein yang terdiri dari 82 sampai dengan 96 persen polipeptida dan 4 sampai dengan 18 persen karbohidrat. Antibodi ini terdapat dalam berbagai cairan tubuh, tetapi di dalam serum darah terkandung konsentrasi yang tertinggi dan paling mudah diperoleh dalam jumlah yang banyak untuk analisis. Pada umumnya lebih dikenal sebagai imunoglobulin dan dapat disingkat menjadi Ig (Goodman dan An, 1978; Kresno, 1984).

Imunoglobulin terdiri dari beberapa klas, yaitu: Ig G, Ig M, Ig A, Ig E, dan Ig D.

Imunoglobulin G terdapat dalam serum darah pada konsentrasi tertinggi dan mempunyai peranan utama dalam mekanisme pertahanan yang diperantarai oleh antibodi. Ig G ini mudah keluar dari pembuluh darah dan cepat mengambil bagian utama dalam mekanisme pertahanan pada ruang jaringan dan permukaan tubuh.

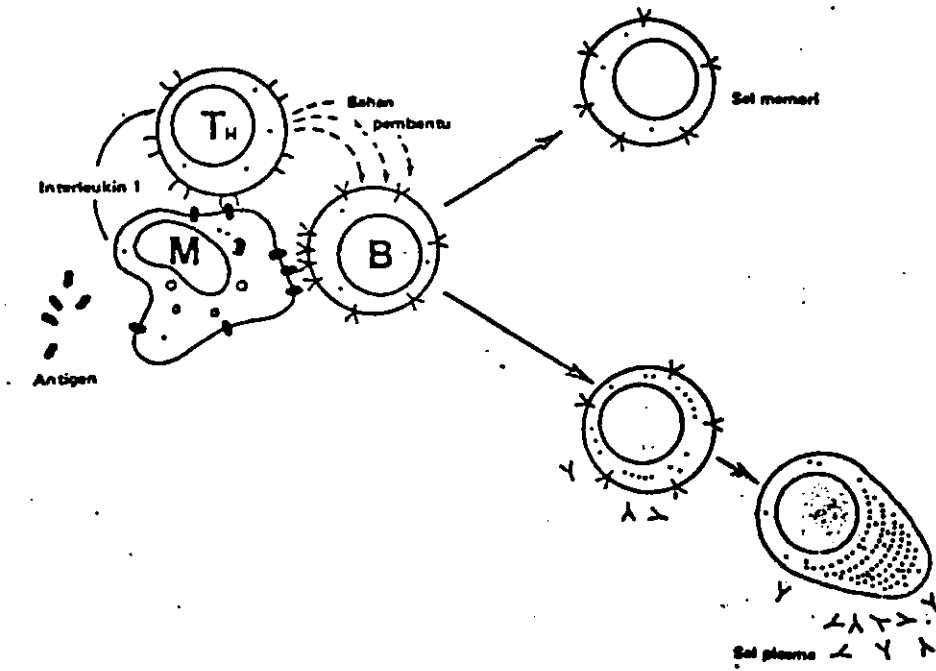
Imunoglobulin M terdapat dalam konsentrasi nomor dua tertinggi pada serum dari kebanyakan hewan dan merupakan imunoglobulin utama yang dihasilkan dalam tanggap kebal primer. Ig M juga diproduksi dalam tanggap kebal sekunder, tetapi jumlahnya tertutup oleh produksi yang banyak sekali dari Ig G pada tanggap kebal ini. Ig M terutama terbatas dalam sistem pembuluh darah dan oleh karena itu mungkin kurang berperan dalam memberi perlindungan pada cairan jaringan atau sekresi tubuh.

Imunoglobulin A merupakan imunoglobulin utama yang terdapat dalam sekresi eksternal tubuh dan oleh karena itu mempunyai peranan yang sangat penting dalam perlindungan saluran-saluran intestinal, respirasi, urogenital, kelenjar susu dan mata terhadap invasi mikroba.

Imunoglobulin E terdapat dalam konsentrasi sangat rendah pada serum dari berbagai jenis hewan dan akan

dihancurkan oleh pemanasan 56 derajat Celcius selama 30 menit.

Imunoglobulin D terdapat terutama pada permukaan beberapa sel B dan telah dibuktikan terdapat pada hewan percobaan namun belum berhasil diperlihatkan terdapat pada sebagian besar hewan piaraan (Hokana dan Nakanura, 1982; Kresno, 1984; Roitt, 1985; dan Tizard, 1988).



Gambar 3. Tanggap Sel B terhadap Antigen (Tizard, 1988)

Sel B dapat tanggap terhadap antigen karena mempunyai reseptor antigen khusus pada permukaannya dan suatu sel B dapat mengikat dan menanggapi hanya deter-

minan antigen yang ditujukan terhadap imunoglobulin reseptornya.

Terdapat kira-kira 10^4 sampai dengan 10^5 molekul imunoglobulin reseptor pada permukaan setiap sel B yang mempunyai umur pendek ini, yaitu beberapa hari atau beberapa minggu.

Bila antigen melekat pada imunoglobulin reseptornya maka sel B akan terangsang untuk membentuk antibodi, tetapi sebelumnya pertama-tama antigen harus diolah terlebih dahulu oleh makrofag dan diberikan kepada sel B setelah difiksasi di permukaan makrofag. Selain itu kadang-kadang dibutuhkan aktivitas dari sel T tertentu di dekatnya, yaitu sel T pembantu yang juga harus menanggapi antigen yang sama. Sel T pembantu digiatkan oleh interleukin 1, yaitu suatu bahan pembantu yang larut dan dikeluarkan oleh makrofag untuk meningkatkan tanggap sel B selain interleukin 2 yang dikeluarkan oleh sel T.

Sel B yang sedang tanggap akan membesar dan mulai membagi diri, kemudian selanjutnya akan berdiferensiasi menjadi dua populasi sel yang berbeda morfologi dan fungsinya. Sel dari satu populasi memperoleh kemampuan untuk membuat sejumlah besar antibodi dan disebut sel plasma sedangkan sel dalam populasi yang lain tetap mempunyai morfologi yang tidak berubah dan berfungsi

sebagai sel memori (Kresno, 1984; Roitt, 1985; Jawetz *et al.*, 1984; dan Tizard, 1988).

Pada mamalia terdapat anggapan bahwa jaringan limfoid yang mempunyai hubungan dengan saluran pencernaan, misalnya: tonsil, bercak-bercak peyer, dan apendiks mungkin merupakan sumber-sumber limfosit B yang penting (Jawetz *et al.*, 1984; Tizard, 1988).

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian ini dimulai dari tanggal 28 April 1990 dan berakhir tanggal 6 Juli 1990.

Materi Penelitian

Pada penelitian ini dipergunakan 36 ekor hewan percobaan mencit betina *strain* BALB/c yang berumur dua bulan dan belum pernah beranak dengan berat badan berkisar antara 20 sampai dengan 22 g. Mencit ini diperoleh dari Pusat Veterinaria Farna (Pusvetna), Surabaya. Kandang mencit yang digunakan adalah berupa enam buah kotak plastik berukuran 22 x 16 x 8 cm³ yang dilapisi aluminium foil dan bagian dasar diberi alas berupa sekam padi. Masing-masing kotak diletakkan di dalam rak khusus yang terdiri dari tempat pakan dan sekaligus berfungsi sebagai penutup serta tempat botol air minum. Pakan mencit yang digunakan berupa pakan ayam Par G produksi P.T. Comfeed Indonesia.

Bahan utama yang digunakan adalah ekstrak daun sirih yang diperoleh dari bagian Biologi Farnasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Selain itu juga digunakan sel darah merah domba, heparin, larutan garam penyangga fosfat (*Phosphate Buffered Saline = PBS*), alkohol 70 persen, kapas, boorwater, dan aquades steril.

Peralatan yang dipergunakan pada penelitian ini adalah sterilisator, pembakar bunsen, timbangan cent-ogram o-Haus dan tabung seng tertutup untuk menimbang mencit, sonde untuk pemberian ekstrak daun sirih pada mencit, dan kamar hitung Malassez serta alat penghitung (*counter hand*) untuk menghitung jumlah sel darah merah domba yang digunakan dalam penelitian.

Alat-alat lain yang digunakan pada uji aktivitas tanggap kebal berperantara sel adalah *disposable syringe* 1 ml, 10 ml, dan 20 ml, sentrifus dan tabung sentrifus, pipet Pasteur, tabung reaksi beserta raknya, pipet Eppendorf 100 ul, *object glass* dan *cover glass*, mikroskop, dan mikrometer sekrup untuk mengukur penebalan telapak kaki mencit.

Alat-alat perlengkapan lain yang digunakan pada uji aktivitas pembentukan imunoglobulin adalah *disposable syringe* 1 ml, 10 ml, 20 ml, pipet Pasteur, Fisher sentrifus dan *microtube*, pipet Eppendorf 25 ul, 50 ul, dan 100 ul, lemari pendingin (*freezer*), *microplate* dengan dasar berbentuk huruf U untuk uji hemagglutinasi (HA) mikrotehnik, sentrifus dan tabung sentrifus,

tabung reaksi beserta raknya, *object glass* dan *cover glass*, mikroskop, dan inkubator.

Metode Penelitian

Persiapan

Menyediakan 36 ekor mencit betina berumur dua bulan dan belum pernah beranak dengan berat badan berkisar antara 20 sampai dengan 22 g.

Membagi secara acak mencit-mencit tersebut menjadi enam kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor mencit. Tiga kelompok yang pertama digunakan untuk pengujian aktivitas tanggap kebal berperantara sel. Tiga kelompok lainnya untuk pengujian aktivitas pembentukan imunoglobulin.

Masing-masing kelompok diberi pakan dan minuman secara *ad libitum*.

Menyediakan ekstrak daun sirih sesuai dengan dosis yang digunakan, yaitu 50 mg/ 25 g berat badan mencit.

Prosedur Penelitian

Uji Aktivitas Tanggap Kebal Berperantara Sel

Mencit untuk pengujian aktivitas tanggap kebal berperantara sel yang diamati melalui reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH), terdiri dari tiga kelompok dan masing-masing kelompok diberi perlakuan, yaitu:

Kelompok I: Enam ekor mencit diberi ekstrak daun sirih secara oral dengan volume 0,5 ml sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut, lima hari kemudian disensitisasi dengan sel darah merah domba sejumlah 10^8 sel dalam volume 0,04 ml yang diinjeksikan secara intradermal pada telapak kaki belakang kiri.

Kelompok II: Enam ekor mencit diberi ekstrak daun sirih secara oral dengan volume 0,5 ml sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut, sepuluh hari kemudian disensitisasi dengan sel darah merah domba sejumlah 10^8 sel dalam volume 0,04 ml yang diinjeksikan secara intradermal pada telapak kaki belakang kiri.

Kelompok III: Enam ekor mencit diberi ekstrak daun sirih secara oral dengan volume 0,5 ml sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut, 15 hari kemudian disensitisasi dengan sel darah merah domba sejumlah 10^8 sel dengan volume 0,04 ml yang diinjeksikan secara intradermal pada telapak kaki belakang kiri.

Pada semua kelompok tersebut di atas, dua hari setelah disensitisasi dengan sel darah merah domba yang diinjeksikan secara intra dermal pada telapak kaki belakang kiri maka dilakukan uji tantang (*challenge*) dengan 0,04 ml sel darah merah domba yang mengandung 10^8 sel dan diinjeksikan secara intra dermal pada telapak kaki belakang kanan mencit (Hurtrel *et al.*, 1981)

Duapuluh empat jam setelah dilakukan uji tantang maka dilanjutkan dengan pengukuran kedua telapak kaki mencit pada masing-masing kelompok perlakuan (Coon dan Hunter, 1975).

Pada pengukuran telapak kaki mencit digunakan alat pengukur yang bernama mikrometer sekrup dengan ketelitian 0,01 mm.

Hasil yang diamati adalah perbedaan penebalan telapak kaki kanan terhadap kaki kiri yang menunjukkan intensitas reaksi hipersensitivitas tipe lambat yang timbul (Stites, 1978; Fuster dan Lagrange, 1982).

Penghitungan Sel Darah Merah Domba

Darah domba diambil dari vena jugularis dengan menggunakan *disposable syringe* steril yang berisi anti-koagulan Heparin, kemudian darah tersebut dipindahkan ke dalam tabung sentrifus secara perlahan-lahan melalui

dinding tabung dan disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan dilakukan pencucian dengan menambahkan larutan PBS yang dicampurkan secara perlahan-lahan melalui dinding tabung untuk kemudian disentrifus lagi. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali.

Menghitung sel darah merah domba dengan mengambil 0,1 ml sel darah merah domba yang didapat setelah selesai pencucian, dengan menggunakan pipet Eppendorf 100 ul. Dilakukan pengenceran 10^{-1} yang dilanjutkan 10^{-2} sampai 10^{-3} dengan menggunakan larutan PBS, kemudian dari pengenceran 10^{-3} tersebut diambil dengan menggunakan pipet Eppendorf dan diteteskan pada kamar hitung Malassez yang telah diberi *cover glass*. Dilihat dengan mikroskop dan dilakukan penghitungan sel-sel darah merah domba yang terdapat di dalam 10 kotak pada kamar hitung Malassez.

Jumlah sel darah merah per ml dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$N = n \times 10 \times 1/10 \times 10^3 \times \text{pengenceran}$$

Keterangan :

N = Jumlah sel darah merah domba per ml

n = Jumlah sel darah merah domba dalam 10 kotak
terhitung

- 10 = Jumlah kotak yang di dalamnya terdapat sel darah merah domba yang dihitung
- 1/10 = Tinggi masing-masing kotak (dalam mm)
- 10^3 = Perubahan satuan dari mm^3 ke cm^3

Uji Aktivitas Pembentukan Imunoglobulin

Mencit untuk uji aktivitas pembentukan imunoglobulin yang diamati melalui uji hemagglutinasi (HA) juga terdiri dari tiga kelompok, masing-masing kelompok tersebut diberi perlakuan sebagai berikut:

Kelompok I: Enam ekor mencit diberi ekstrak daun sirih secara oral dengan volume 0,5 ml sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut, 24 jam kemudian diinjeksi dengan sel darah merah domba sejumlah $2,5 \times 10^8$ sel dalam volume 0,25 ml secara intra vena pada vena caudalis.

Kelompok II: Enam ekor mencit diberi ekstrak daun sirih secara oral dengan volume 0,5 ml sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut, 48 jam kemudian diinjeksi dengan sel darah merah domba sejumlah $2,5 \times 10^8$ sel dalam volume 0,25 ml secara intra vena pada vena caudalis.

Kelompok III: Enam ekor mencit diberi ekstrak daun sirih secara oral dengan volume 0,5 ml sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut, 72 jam kemudian diinjeksi dengan sel darah merah domba sejumlah $2,5 \times 10^8$ sel dalam volume 0,25 ml secara intra vena pada vena caudalis.

Pada semua kelompok mencit perlakuan tersebut di atas, setelah satu minggu dari masing-masing perlakuan yang terakhir maka dilakukan pengambilan darah dari sinus retro supraorbitalis mencit dan diulangi lagi pada minggu kedua dan minggu ketiga untuk menganalisis respon antibodi yang timbul (Renoux dan Renoux, 1974; Smith dan Mangkowitz, 1988).

Darah yang telah diperoleh dengan menggunakan pipet Pasteur tersebut, kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama tiga sampai lima menit. Serum yang telah terpisah diambil dengan menggunakan pipet Eppendorf lalu disimpan ke dalam freezer untuk selanjutnya siap dilakukan uji HA mikroteknik dengan menggunakan sel darah merah domba sebagai antigen. Sel darah merah domba sering digunakan sebagai sarana dalam berbagai penelitian imunologi (Carpenter, 1975; Tizard, 1988).

Uji Hemagglutinasi (HA) Mikrotehnik

Pembuatan Suspensi Sel Darah Merah Domba 1 Persen

Darah domba diambil dari vena jugularis dengan menggunakan *disposable syringe* steril yang berisi anti-koagulan heparin, kemudian darah tersebut dipindahkan ke dalam tabung sentrifus secara perlahan-lahan melalui dinding tabung dan disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan dilakukan pencucian dengan menambahkan larutan PBS yang dicampurkan secara perlahan-lahan melalui dinding tabung untuk kemudian disentrifus lagi. Pencucian ini dilakukan sebanyak tiga kali dengan cara yang sama.

Membuat suspensi sel darah merah domba 1 persen dengan mencampurkan 1 ml sel darah merah domba 100 persen yang didapat setelah selesai pencucian dengan 9 ml larutan PBS sehingga menjadi suspensi sel darah merah domba 10 persen. Setelah itu diambil sebanyak 1 ml suspensi sel darah merah domba 10 persen dan ditambahkan 9 ml larutan PBS sehingga akhirnya menjadi suspensi sel darah merah domba 1 persen yang siap digunakan untuk uji HA.

Pelaksanaan Uji Hemagglutinasi (HA)

Mengisi lubang *microplate* 1 dan 2 dengan 0,025 ml serum serta lubang 2 sampai dengan lubang 12 dengan

larutan *PBS* sebanyak 0,025 ml. Pengisian dilakukan dengan menggunakan pipet Eppendorf.

Membuat pengenceran juga dengan menggunakan pipet Eppendorf dimulai dari lubang *microplate* 2 yang dipindahkan ke lubang 3 setelah dicampur terlebih dahulu, kemudian dari lubang 3 ke lubang 4 dan demikian seterusnya sampai dengan lubang 11. Dari lubang 11 setelah dicampur lalu dibuang sebanyak 0,025 ml.

Menambahkan 0,025 ml sel darah merah domba 1 persen ke dalam semua lubang *microplate* dengan menggunakan pipet Eppendorf sehingga masing-masing lubang volumenya menjadi 0,05 ml.

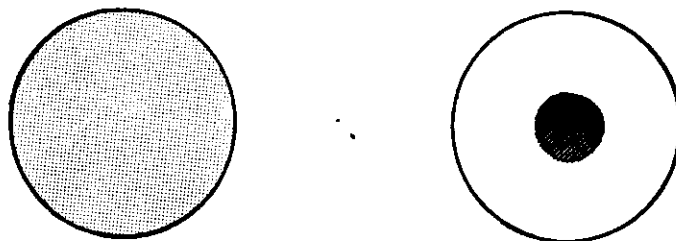
Microplate digoyangkan sampai cairan di dalamnya tercampur merata dan kemudian dimasukkan ke dalam inkubator selama kurang lebih 30 menit.

Dilakukan pembacaan titer dengan mencatat lubang *microplate* dengan pengenceran tertinggi dari serum yang masih dapat mengagglutinasi 100 persen dari sel darah merah domba.

Lubang *microplate* 1 digunakan sebagai kontrol serum dan lubang *microplate* 12 digunakan kontrol sel darah merah domba (Egan *et al.*, 1974; Baker dan Breach, 1980).

Pembacaan Uji Hemagglutinasi (HA)

Memperhatikan masing-masing lubang dengan membandingkannya terhadap lubang kontrol sel darah merah domba (lubang 12). Apabila terdapat agglutinasi terhadap sel darah merah domba maka pada dasar lubang terlihat adanya lapisan sel darah merah domba berupa bintik-bintik halus homogen dengan tepi difus atau tepi yang tidak rata. Bila tidak terdapat agglutinasi terhadap sel darah merah domba maka dasar lubang *microplate* akan terlihat adanya endapan sel darah merah yang tampak bulat atau seperti cincin (gambar 4).



Gambar 4. Gambaran Pembacaan Uji HA Mikrotehnik

Peubah Yang Diamati

Untuk mengamati reaksi hipersensitivitas tipe lambat yang timbul maka dilakukan pengukuran penebalan telapak kaki kanan dan juga telapak kiri mencit, selanjutnya dihitung selisihnya.

Pada pengamatan aktivitas pembentukan imunoglobulin dilakukan pencatatan titer tertinggi dari uji HA

terhadap serum mencit yang diteliti, masing-masing pada minggu pertama, minggu kedua, dan minggu ketiga setelah perlakuan yang terakhir dari masing-masing kelompok mencit.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap untuk uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat. Rancangan petak terbagi (*split plot design*) untuk uji aktivitas pembentukan imunoglobulin. Data hasil penelitian dianalisa dengan metode analisis varian F, kemudian bila terdapat perbedaan yang bermakna atau sangat bermakna di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf kepercayaan $\alpha = 5$ persen atau 1 persen (Steel dan Torrie, 1980).

HASIL PENELITIAN

Pelaksanaan penelitian yang telah dilakukan meliputi pemberian ekstrak daun sirih pada mencit sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut, dilanjutkan dengan uji tanggal kebal berperantara sel yang diamati melalui reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH) dan uji aktivitas pembentukan imunoglobulin yang diamati melalui uji hemagglutinasi (HA).

Pada uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat, data hasil penelitian selengkapnya mengenai selisih pengukuran penebalan kedua telapak kaki mencit pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 1.

Nilai rata-rata selisih penebalan telapak kaki mencit dari enam kali ulangan pada masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 1.

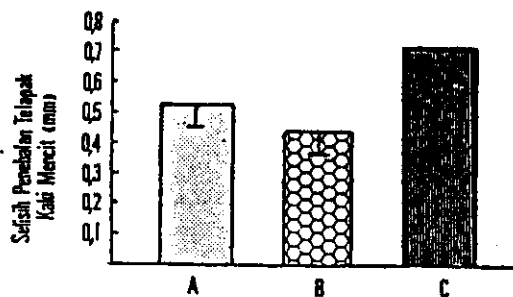
Tabel 1. Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku (S_D) Selisih Penebalan Telapak Kaki Kelompok Mencit Perlakuan (dalam Satuan Milimeter)

	Perlakuan hari ke		
	5	10	15
\bar{X}	0,54	0,46	0,72
S_D	0,09	0,08	0,04

Dari data yang tercantum pada tabel 1. dapat dilihat adanya perbedaan nilai rata-rata dari selisih

penebalan telapak kaki antara kelompok mencit perlakuan hari ke 5, hari ke 10, dan hari ke 15 setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir. Apabila diperhatikan lebih lanjut, maka kelompok mencit yang menunjukkan reaksi hipersensitivitas tipe lambat yang paling tinggi terjadi pada hari ke 15 setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir ($0,72 \pm 0,04$ mm), sedangkan nilai rata-rata selisih penebalan telapak kaki kelompok mencit yang menggambarkan reaksi hipersensitivitas tipe lambat pada perlakuan hari ke 5 dan hari ke 10, berturut-turut adalah $0,54 \pm 0,09$ mm dan $0,46 \pm 0,08$ mm.

Untuk lebih jelasnya hasil penelitian berupa selisih penebalan telapak kaki mencit terhadap pemberian ekstrak daun sirih pada berbagai perlakuan disajikan dalam bentuk histogram seperti yang tercantum pada Gambar 5.



Gambar 5. Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku ($S_{\bar{D}}$) Selisih Penebalan Telapak Kaki Mencit

Keterangan:

- A. Selisih penebalan telapak kaki kelompok mencit yang diukur reaksi hipersensitivitas tipe lambat pada perlakuan hari ke 5.
- B. Selisih penebalan telapak kaki kelompok mencit yang diukur reaksi hipersensitivitas tipe lambat pada perlakuan hari ke 10.
- C. Selisih penebalan telapak kaki kelompok mencit yang diukur reaksi hipersensitivitas tipe lambat pada perlakuan hari ke 15.

Pada histogram yang disajikan (gambar 5), terlihat bahwa reaksi hipersensitivitas tipe lambat kelompok mencit pada perlakuan hari ke 10 adalah lebih rendah dibandingkan kelompok mencit pada perlakuan hari ke 5 maupun hari ke 15.

Hasil analisis varian F terhadap data selisih penebalan telapak kaki mencit pada masing-masing perlakuan (lampiran 2) menunjukkan bahwa pada taraf kepercayaan $\alpha = 1$ persen, derajat bebas (db) sisa = 15 didapatkan F tabel = 6,36 serta F hitung = 18,50.

Berdasarkan hasil yang diperoleh itu (lampiran 2), dapat disimpulkan adanya perbedaan yang sangat nyata di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan. Hal ini dinyatakan dengan nilai F hitung yang lebih besar daripada F tabel pada taraf kepercayaan $\alpha = 1$ persen. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih dengan dosis 50 mg/25 g berat badan mencit pada berbagai kelompok mencit perlakuan, memberikan perbe-

daan yang sangat nyata dalam hal pembentukan aktivitas tanggap kebal berperantara sel yang dapat dilihat melalui uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat yang telah dilakukan.

Sehubungan dengan adanya perbedaan yang sangat bermakna di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan tersebut, maka perlu diadakan pengujian lebih lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf kepercayaan $\alpha = 5$ persen atau 1 persen yang perhitungannya disajikan pada Lampiran 3.

Berdasarkan hasil uji jarak berganda Duncan pada taraf kepercayaan $\alpha = 1$ persen, dapat ditentukan notasi untuk masing-masing perlakuan seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Notasi Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih terhadap Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat pada Mencit.

Perlakuan	\bar{X}	S_D	Notasi
C	0,72	0,04	a
B	0,46	0,08	b
A	0,54	0,09	b

Hasil penentuan notasi-notasi tersebut (tabel 2) tidak menunjukkan suatu perbedaan yang bermakna antara kelompok mencit pada perlakuan hari ke 5 dengan kelompok mencit pada perlakuan hari ke 10. Sesuai dengan

hasil perhitungan yang dicantumkan pada lampiran 3, kelompok-kelompok mencit perlakuan tersebut memiliki notasi yang sama (b).

Lain halnya dengan kelompok mencit yang diukur reaksi hipersensitivitas tipe lambat pada perlakuan hari ke 15, memiliki perbedaan yang sangat bermakna terhadap kelompok-kelompok mencit perlakuan lainnya yang ditunjukkan dengan penentuan notasi a dan selain itu juga menunjukkan reaksi hipersensitivitas tipe lambat yang tertinggi (lampiran 3).

Selanjutnya pada uji hemagglutinasi (HA), data hasil penelitian selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4 sedangkan nilai rata-rata titer HA (log 2) terhadap perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam dapat dilihat pada Tabel 3.

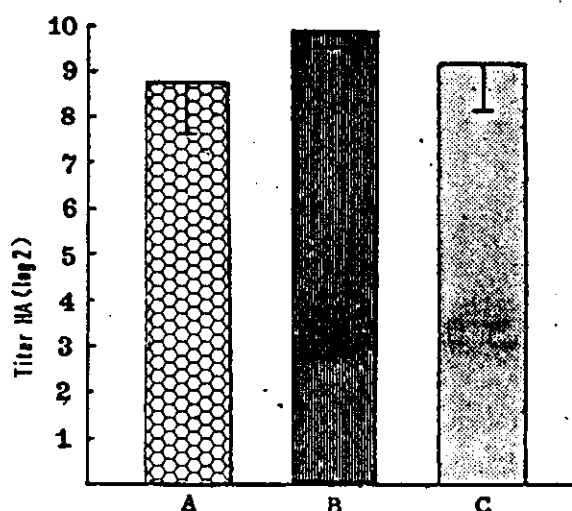
Tabel 3. Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku (S_D) Titer HA (log 2) pada Masing-masing Kelompok Mencit Perlakuan

	Perlakuan		
	24 jam	48 jam	72 jam
\bar{X}	8,78	9,89	9,28
S_D	1,22	0,32	1,13

Pada data yang tercantum di dalam tabel 3, dapat dilihat adanya perbedaan nilai rata-rata titer HA (log 2) di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan. Apabila

diperhatikan lebih lanjut, maka kelompok mencit yang menunjukkan nilai rata-rata titer HA ($\log 2$) yang tertinggi terjadi pada perlakuan 48 jam .

Secara skematis hasil penelitian berupa titer HA ($\log 2$) pada berbagai perlakuan disajikan dalam bentuk histogram seperti yang tercantum pada Gambar 6.



Gambar 6. Nilai Rataan (\bar{X}) dan Simpangan Baku (S^T) Titer HA ($\log 2$) pada Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan

Keterangan:

- A. Titer HA ($\log 2$) kelompok mencit yang diinjeksi sel darah merah domba 24 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir.
- B. Titer HA ($\log 2$) kelompok mencit yang diinjeksi sel darah merah domba 48 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir.
- C. Titer HA ($\log 2$) kelompok mencit yang diinjeksi sel darah merah domba 72 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir.

Pada histogram yang disajikan tersebut (gambar 6) menunjukkan bahwa titer HA (log 2) kelompok mencit yang diinjeksi sel darah merah domba 24 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir adalah lebih rendah dibandingkan titer HA (log 2) kelompok mencit yang diinjeksi sel darah merah domba 48 jam maupun 72 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir. Hasil analisis varian F terhadap data titer HA (log 2) dari waktu pengamatan pada masing-masing minggu (faktor A) yang dapat dilihat pada lampiran 5, menunjukkan bahwa pada taraf kepercayaan $\alpha = 5$ persen, derajat bebas (db) sisa = 10 didapatkan F tabel = 4,10 serta F hitung = 1,97.

Dari hasil tersebut (lampiran 5) maka dapat disimpulkan tidak adanya perbedaan titer HA (log 2) yang bermakna di antara minggu I, minggu II, dan minggu III (faktor A). Hal ini dinyatakan dengan nilai F hitung yang lebih kecil daripada F tabel pada taraf kepercayaan $\alpha = 5$ persen.

Sebaliknya hasil analisis varian F terhadap data titer HA (log 2) dari masing-masing kelompok mencit perlakuan (lampiran 5), menunjukkan bahwa pada taraf kepercayaan $\alpha = 1$ persen, derajat bebas (db) sisa = 30 didapatkan nilai F tabel = 5,39 serta F hitung = 7,75.

Berdasarkan hasil analisis varian F yang diperoleh tersebut (lampiran 5), dapat disimpulkan adanya perbedaan titer HA ($\log 2$) yang sangat nyata di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan (faktor B). Hal ini dinyatakan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari pada F tabel pada taraf kepercayaan $\alpha = 1$ persen. Hasil yang demikian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih dengan dosis 50 mg/25 g berat badan mencit memberikan perbedaan yang sangat bermakna dalam hal peningkatan aktivitas pembentukan imunoglobulin di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan, yang dapat dilihat melalui uji HA yang telah dilakukan.

Sehubungan dengan adanya perbedaan yang sangat bermakna di antara kelompok-kelompok mencit perlakuan tersebut, maka perlu diadakan pengujian lebih lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf kepercayaan $\alpha = 5$ persen atau 1 persen yang perhitungannya disajikan pada Lampiran 6.

Berdasarkan hasil uji jarak berganda Duncan pada taraf kepercayaan $\alpha = 5$ persen dapat ditentukan notasi-notasi untuk mengklasifikasikan masing-masing perlakuan seperti yang terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Notasi Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih pada Berbagai Kelompok Mencit Perlakuan

Perlakuan	\bar{X}	S_D	Notasi
48 jam	9,89	0,32	a
72 jam	9,28	1,13	ab
24 jam	8,78	1,22	b

Hasil penentuan notasi-notasi tersebut (tabel 4) dan dari hasil perhitungan yang disajikan pada lampiran 6, maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan 48 jam menunjukkan titer HA (log 2) yang tertinggi dengan notasi a dan memiliki perbedaan yang bermakna dengan perlakuan 24 jam yang mempunyai notasi b. Sebaliknya perlakuan 72 jam yang mempunyai notasi ab, menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna dengan perlakuan 48 jam maupun perlakuan 24 jam (lampiran 6).

Untuk mengetahui ada atau tidaknya interaksi antara faktor waktu pengamatan (minggu) dan faktor perlakuan injeksi sel darah merah domba (jam), maka dapat dilihat dari hasil analisis varian F pada taraf kepercayaan $\alpha = 5$ persen, derajat bebas (db) = 30 dan didapatkan F tabel = 4,02 serta F hitung = 1,11.

Hasil tersebut menunjukkan tidak adanya interaksi AB, yaitu antara faktor A (minggu) dan faktor B (jam)

disebabkan oleh nilai F hitung yang lebih kecil daripada F tabel (lampiran 5).

PEMBAHASAN

Apabila tubuh kontak dengan antigen maka antigen tersebut akan ditangkap, diolah, dan kemudian ditanggapi oleh sistem pembentuk antibodi atau sistem kebal berperantara sel dengan membentuk antibodi khusus dan/atau sel yang mampu menyingkirkan antigen tersebut (Tizard, 1988).

Mekanisme pertahanan tubuh yang dikenal melalui respon kekebalan humoral dan respon kekebalan seluler tersebut adalah merupakan reaksi aktif tubuh dengan aspek yang berbeda tetapi pada sebagian besar penyakit infeksi ataupun peradangan yang disebabkan oleh mikroorganisme, kedua mekanisme kekebalan tersebut tidak dapat dipisahkan secara mutlak.

Suatu perlakuan yang dikenakan pada sistem kekebalan dengan tujuan untuk mengubah kapasitas fungsional salah satu atau beberapa parameter sistem kekebalan tersebut dinamakan dengan imunomodulasi atau imunoregulasi.

Bila sistem kekebalan diatur dengan perlakuan tertentu, maka efek yang terjadi pada sistem tersebut dapat naik, turun atau tetap (Bendryman, 1988).

Sesuai dengan pengaturan sistem kekebalan terhadap suatu substansi, maka dilakukan penelitian terhadap

salah satu tanaman obat tradisional, yaitu daun sirih yang antara lain sering digunakan untuk pengobatan penyakit kulit dan gatal-gatal, obat luka gigitan ular dan serangga, keradangan serta untuk menyegarkan tubuh. Keseluruhannya itu dapat dikaitkan dengan aktivitas sistem kekebalan yang telah ditemukan pada ekstrak daun sirih.

Untuk mengetahui lebih lanjut pengaruhnya terhadap aktivitas sistem kekebalan tersebut maka diamati melalui uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH) dan uji hemagglutinasi (HA) yang telah dilakukan.

Pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) pada penelitian ini dilakukan secara oral sesuai dengan cara penggunaan lazimnya, sedangkan sel darah merah domba yang bertindak sebagai antigen juga telah digunakan antara lain oleh Egan *et al.* (1974) dan Hurtrel *et al.* (1981) dalam berbagai penelitiannya.

Uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH) merupakan uji yang paling sering dilakukan dalam dunia kedokteran hewan maupun dunia kedokteran untuk melihat status respon kekebalan seluler.

Kekebalan seluler yang dievaluasi melalui uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat tersebut, menggunakan sel darah merah domba dengan dosis 10^8 sel dalam volume 0,04 ml. Pada dosis ini, sel darah merah domba

bersifat sebagai antigen *thymo dependent*. Ini berarti untuk terjadinya suatu reaksi, sangat memerlukan bantuan limfosit T yang pembentukannya tergantung pada timus dan akan mengatur kekebalan melalui sel (Fuster dan Lagrange, 1982; Kresno, 1984).

Hasil penelitian dari uji reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH) pada tabel 1, menunjukkan bahwa reaksi hipersensitivitas tipe lambat tertinggi terjadi pada hari ke 15 setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir dan memiliki perbedaan yang sangat bermakna dengan perlakuan hari ke 5 maupun hari ke 10 (tabel 2).

Pada penelitian ini disimpulkan bahwa pembentukan kekebalan seluler yang tertinggi dicapai pada hari ke 15 setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir. Hal ini sesuai dengan yang telah dikemukakan oleh Hokama dan Nakamura (1982) bahwa limfosit T yang berperan dalam kekebalan seluler ini secara umum dapat dideteksi mulai 7 sampai dengan 14 hari setelah kontak dengan suatu substansi yang dapat menimbulkan kekebalan dan bertahan dalam waktu yang belum dapat ditentukan atau dapat selama berbulan-bulan.

Pada respon kekebalan humoral yang diperantarai oleh limfosit B, dapat dievaluasi melalui uji hemagglutinasasi (HA).

Sel darah merah domba yang digunakan sejumlah $2,5 \times 10^8$ sel dalam volume 0,25 ml. Alasan penggunaan dosis ini adalah karena pada dosis tersebut sel darah merah domba bersifat sebagai antigen *thymo independent*, ini artinya tidak tergantung pada timus untuk terjadinya suatu reaksi dan berhubungan dengan aktivitas pembentukan antibodi (Renoux dan Renoux, 1974; Kresno, 1984).

Berdasarkan hasil penelitian dari uji HA (tabel 3), ditunjukkan bahwa titer HA (log 2) yang tertinggi dicapai pada perlakuan 48 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir dan menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan perlakuan 24 jam, tetapi tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan perlakuan 72 jam (tabel 4).

Hasil pengamatan titer HA (log 2) antara minggu pertama, minggu kedua, dan minggu ketiga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada semua kelompok mencit perlakuan (lampiran 5).

Menurut Volk dan Wheeler (1988) antibodi dapat ditemukan dalam tubuh sekitar lima hari setelah masuknya bahan asing ke dalam tubuh dan kadarnya di dalam serum akan meningkat serta mencapai puncaknya dalam dua sampai tiga minggu. Pada penelitian ini ditunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih telah dapat menim-

bulkan antibodi yang cukup tinggi mulai minggu pertama dan relatif tetap dapat bertahan sampai dengan minggu ketiga.

Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih yang dapat meningkatkan aktivitas pembentukan antibodi dan berperan dalam kekebalan humoral tersebut, paling tinggi terjadi pada perlakuan 48 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir dan antibodi yang telah terbentuk mulai minggu pertama dapat tetap dipertahankan sampai dengan minggu ketiga.

Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dengan demikian bertindak memekakan atau mensensitisasi sel-sel tubuh yang bekerja dalam sistem kekebalan, sehingga bila ada antigen yang masuk ke dalam tubuh maka tubuh telah siap untuk menghadapinya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian ekstrak daun sirih secara oral dapat menyebabkan pembentukan kekebalan seluler yang tertinggi pada hari ke 15 setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan juga bahwa pemberian ekstrak daun sirih menunjukkan peningkatan kekebalan humoral yang tertinggi pada perlakuan 48 jam setelah pemberian ekstrak daun sirih yang terakhir dan antibodi yang terbentuk telah dapat ditemukan dalam serum mulai minggu pertama serta dapat dipertahankan sampai dengan minggu ketiga.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui zat-zat kandungan yang mana pada daun sirih yang menyebabkan peningkatan aktivitas sistem kekebalan.

Penelitian lebih lanjut juga dapat dilakukan dengan menggunakan metode uji yang lain.

RINGKASAN

DEWI PUDJIATI ALIE. Evaluasi pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap aktivitas sistem kekebalan pada mencit (Di bawah bimbingan (alm) R. BENDRYMAN S., SRI SUBEKTI B.S. sebagai pembimbing pertama dan NANIK SIANITA W. sebagai pembimbing kedua).

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui lebih lanjut pengaruh pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap aktivitas tanggap kebal berperantara sel dan aktivitas pembentukan imunoglobulin pada mencit.

Ke tiga puluh enam ekor mencit betina sebagai hewan percobaan dalam penelitian ini dibagi dalam tiga kelompok untuk uji tanggap kebal berperantara sel yang masing-masing terdiri dari enam ekor dan tiga kelompok lainnya untuk uji aktivitas pembentukan imunoglobulin yang masing-masing juga terdiri dari enam ekor. Perlakuan meliputi pemberian ekstrak daun sirih secara oral sebanyak dua kali sehari selama dua hari berturut-turut. Pada uji aktivitas tanggap kebal berperantara sel, 5, 10, dan 15 hari kemudian disensitisasi dengan sel darah merah domba yang diinjeksikan secara intradermal pada telapak kaki belakang kiri. Dua hari setelah itu dilakukan ujiantang (challenge) dengan

sel darah merah domba yang diinjeksikan secara intra dermal pada telapak kaki belakang kanan dan 24 jam kemudian dilakukan pengukuran kedua telapak kaki mencit. Pada uji aktivitas pembentukan imunoglobulin, 24, 48, dan 72 jam kemudian diinjeksi dengan sel darah merah domba secara intra vena pada vena caudalis. Satu minggu setelah itu dilakukan pengambilan darah dari sinus retro supraorbitalis mencit dan diulangi lagi pada minggu kedua dan minggu ketiga.

Berdasarkan rancangan yang digunakan, yaitu rancangan acak lengkap pada uji aktivitas tanggap kebal berperantara sel, didapatkan perbedaan yang sangat bermakna antara perlakuan hari ke 15 dengan perlakuan hari ke 5 maupun hari ke 10 sedangkan pada uji aktivitas pembentukan imunoglobulin yang menggunakan rancangan petak terbagi, didapatkan perbedaan yang bermakna antara perlakuan 48 jam dengan perlakuan 24 jam.

Sesuai dengan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun sirih secara oral, menunjukkan pembentukan kekebalan seluler yang tertinggi pada perlakuan hari ke 15 dan juga menunjukkan peningkatan kekebalan humoral yang tertinggi pada perlakuan 48 jam. Antibodi yang telah terbentuk mulai minggu pertama relatif dapat dipertahankan sampai dengan minggu ketiga.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 1980. *Materia Medika Indonesia IV*. Dep. Kes. R.I. Jakarta.
- Anonimous. 1985. *Tanaman Obat Indonesia I*. Dijen. P.O.M. Jakarta.
- Azwar, A. 1990. *Obat dan Pengobatan Tradisional*. Panasea. 4:40-41.
- Baker, F.J. and M.R. Breach. 1980. *Medical Microbiological Techniques*. Butterworth and Co. London.
- Bach, J.F. 1982. *Immunology*. 2nd. Ed. John Wiley and Sons. Inc. Paris.
- Bellanti, J.A. 1985. *Introduction to Immunology*. In: *Immunology III*. Igaku-Shoin/Saunders International Edition. W.B. Saunders Company. Tokyo.
- Bendryman, R. 1988. *Pengaruh Immunostimulan Biologis pada Penyakit Infeksi*. Temu Ilmiah Immunologi dan Infeksi. Surabaya.
- Carpenter, P.L. 1975. *Immunology and Serology*. 3th. Ed. W.B. Saunders Company. Tokyo.
- Coon, J. and R. Hunter. 1975. *Properties of Conjugated Protein Immunogens which Selectively Stimulate Delayed Type Hypersensitivity*. *J. Immunol.* 114: 1518-1522.
- Dupuy, J.M. and R.A. Good. 1970. *Role of Lymphoid Cells in Passive Transfer with Plasma of Delayed Hypersensitivity in Guinea Pigs*. *J. Immunol.* 105:1111-1115.
- Dzen, S.M., Sri W., S. Santoso, Roekistiningsih, Noorhamdani A.S., S. Islam, dan Sumarno. 1988. *Daya Anti Bakteri In Vivo Infusum Daun Sirih terhadap Beberapa Jenis Kuman yang Diisolasi dari Penderita*. *Medika*. 8:709-711.
- Egan, H.S., W.J. Reeder, and R.D. Ekstedt. 1974. *Effect of Concanavalin A in Vivo in Suppressing The Antibody Response in Mice*. *J. Immunol.* 112: 63-69.

- Effendi, C., P.G. Konthen, dan D.H. Mahdi. 1988. Organ Sasaran pada Penyakit Alergi. Kumpulan Makalah Simposium Alergi dan Penyakit Otoimun. Surabaya.
- Fuster, M.J. and P.H. Lagrange. 1982. Immunomodulation with P40, an Insoluble Delipidated Fraction of *Corynebacterium Granulosum*. *Ann. Immunol.* 133c: 253-287.
- Ganong, W.F. 1983. Fisiologi Kedokteran. Edisi ke 10. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 441-461.
- Goodman, J.W. and An-Chuan Wang. 1978. Immunoglobulins: Structure and Diversity. In: H.H. Fudenberg, D.P. Stites, J.L. Caldwell, and J.V. Wells (ed). *Basic and Clinical Immunology*. 2nd. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos, California.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia II. Badan Litbang Kehutanan. Jakarta. 622-627.
- Hokama, Y. and Nakamura, R.M. 1982. *Immunology and Immunopathology*. 1st. Ed. Little, Brown and Company. Boston.
- Hurtrel, B., M. Hurtrel, and P.H. Lagrange. 1981. Time Course and Histological Differences between Sheep Red Blood Cells and Tuberculin DTH Reactions in Mice. *Ann. Immunol.* 135c:219-230.
- Indah Y.P., Liliana K., Basundari S.U., dan Roswita Z. 1987. Imunitas Seluler pada Neonatus dan Ibunya. *Medika*. 8:761-763.
- Jawetz, E., J.L. Melinck, and E.A. Adelberg. 1984. *Review of Medical Microbiology*. 16th. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos, California.
- Kresno, S.B. 1984. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kresno, S.B. 1988. *Pengantar Hematologi dan Imunohematologi*. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

- Labadie. 1986. Immunomodulative Activities by Constituents and Preparation of Medicinal Plants. Symposium Penelitian Tumbuhan Obat V dan Expo Jamu. Surabaya.
- Mackness, G. 1978. Delayed Hypersensitivity. In: M. Samter (ed). Immunological Diseases I. 3rd. Ed. Little, Brown and Company. USA.
- Marchalonis, J.J. 1978. Cell Cooperation in Immune Responses. In: H.H. Fudenberg, D.P. Stites, J.L. Caldwell, and J.V. Wells (ed). Basic and Clinical Immunology. 2nd. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos, California.
- Mardisiswojo, S. dan H. Radjakmangunsudarso. 1971. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang I. P.T. Karya Wreda. Indonesia.
- Renoux, G. and M. Renoux. 1974. Modulation of Immune Reactivity by Phenylimidothiazole Salts in Mice Immunized by Sheep Red Blood Cells. J. Immunol. 113:779-790.
- Roitt, I.M. 1985. Essential Immunology. 5th. Ed. Blackwell Scientific Publications. London.
- Roitt, I.M. 1985. Pokok-Pokok Ilmu Kekebalan. P.T. Gramedia. Jakarta.
- Sirait, M. 1990. Seminar Pemanfaatan Bahan Alam sebagai Obat. Phyto Medica. 2:86-88.
- Smith, J.B. dan S. Mangkowidjoyo. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 10-36.
- Sriyono. 1990. Uji Aktivitas Immunostimulan Daun Sirih (*Piper betle* L.) pada Mencit. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics. 2nd. Ed. McGraw-Hill Book Company. New York.

- Stites, D.P. 1978. Clinical Laboratory Methods of Detecting Cellular Immune Function. In: H.H. Fudenberg, D.P. Stites, J.L. Caldwell, and J.V. Wells (ed). Basic and Clinical Immunology. 2nd. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos, Ca.
- Tizard, I.R. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Edisi kedua. Penerbit Universitas Airlangga. Surabaya.
- Unanue, E.R. 1978. The Immune Granulomas. In: M. Samter (ed). Immunological Diseases I. 3rd. Ed. Little, Brown Company. USA.
- Volk, W.A. and M.F. Wheeler. 1988. Mikrobiologi Dasar. Edisi kelima. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Wahl, S.M., J.M. Wilton, D.L. Rosenstreich, and J. Oppenheim. 1975. The Role of Macrophages in The Production of Lymphokines by T and B Lymphocytes. J. Immunol. 114:1296-1301.
- Wells, J.V. 1978. Immune Mechanisms in Tissue Damage. In: H.H. Fudenberg, D.P. Stites, J.L. Caldwell, and J.V. Wells (ed). Basic and Clinical Immunology. 2nd. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos, California.
- Wing, E.J. and J.S. Remington. 1978. Delayed Hypersensitivity and Macrophage Functions. In: H.H. Fudenberg, D.P. Stites, J.L. Caldwell, and J.V. Wells (ed). Basic and Clinical Immunology. 2nd. Ed. Lange Medical Publications. Los Altos, Ca.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Pengukuran Penebalan Telapak Kaki Kelompok Mencit Perlakuan (dalam Satuan Milimeter)

Perlakuan hari ke	Penebalan telapak kaki kiri	Penebalan telapak kaki kanan	Selisih penebalan telapak kaki
5	2,94	3,53	0,59
	2,88	3,55	0,67
	3,03	3,50	0,47
	2,94	3,47	0,53
	3,05	3,60	0,55
	2,98	3,39	0,41
Jumlah	17,82	21,04	3,22
Nilai rataan	2,97	3,51	0,54
10	2,61	3,02	0,41
	2,75	3,09	0,34
	2,78	3,30	0,52
	2,62	3,19	0,57
	2,70	3,16	0,46
	2,76	3,20	0,44
Jumlah	16,22	18,96	2,74
Nilai rataan	2,70	3,16	0,46
15	2,71	3,37	0,66
	2,42	3,15	0,73
	2,67	3,45	0,78
	2,68	3,38	0,70
	2,74	3,50	0,76
	2,82	3,52	0,70
Jumlah	16,04	20,37	4,33
Nilai rataan	2,67	3,40	0,72

Lampiran 2. Analisis Varian F terhadap Selisih Penebalan Telapak Kaki Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan dengan Rancangan Acak Lengkap

No.	Selisih penebalan telapak kaki mencit pada perlakuan hari ke		
	5(A)	10(B)	15(C)
1.	0,59	0,41	0,66
2.	0,67	0,34	0,73
3.	0,47	0,52	0,78
4.	0,53	0,57	0,70
5.	0,55	0,46	0,76
6.	0,41	0,44	0,70
Jumlah	3,22	2,74	4,33
Nilai rata-rata	0,54	0,46	0,72

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{(3,22 + 2,74 + 4,33)^2}{18}$$

$$= 5,883$$

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= 0,59^2 + 0,67^2 + \dots + 0,70^2 - \text{FK} \\ &= 0,305 \end{aligned}$$

$$\text{JKP} = \frac{3,22^2 + 2,74^2 + 4,33^2}{6} - \text{FK}$$

$$= 0,221$$

$$\begin{aligned} \text{JKS} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 0,305 - 0,221 \\ &= 0,084 \end{aligned}$$

Lanjutan Lampiran 2.

Sidik Keragaman (SK)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F Hitung	F Tabel 0,05 0,01
Perlakuan	2	0,221	0,111	18,50**	3,68 6,36
Sisa	15	0,084	0,006		
Total	17	0,305			

Lampiran 3. Uji Jarak Berganda Duncan terhadap Nilai Rataan Selisih Penebalan Telapak Kaki Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan

$$\begin{aligned}
 Se &= \sqrt{\frac{KTS}{n}} \\
 &= \sqrt{\frac{0,006}{6}} \\
 &= 0,032
 \end{aligned}$$

$$LSR = SSR \times Se$$

Perlakuan	\bar{X}	$\bar{X} - B$	$\bar{X} - A$	p	SSR		LSR	
					0,05	0,01	0,05	0,01
C ^a	0,72	0,26**	0,18**	3	3,16	4,35	0,101	0,139
A ^b	0,54	0,08		2	3,01	4,17	0,096	0,133
B ^b	0,46			1				

0,72	0,54	0,46
·	·	·
C	A	B
-		
a	b	

Lampiran 4. Hasil Titer HA (log 2) pada Berbagai Kelompok Mencit Perlakuan yang Diberi Ekstrak Daun Sirih

	24 jam	Perlakuan		Jumlah		
		48 jam	72 jam			
Minggu I	8	10	10	28		
	9	10	10	29		
	10	10	8	28		
	5	10	6	21		
	8	10	8	26		
	9	10	10	29		
Jumlah	49	60	52	161		
Nilai rata-rata	8,17	10	8,67			
Minggu II	9	9	9	27		
	10	9	10	29		
	7	10	10	27		
	9	10	10	29		
	9	10	8	27		
	9	10	9	28		
Jumlah	53	58	56	167		
Nilai rata-rata	8,83	9,67	9,33			
Minggu III	10	10	10	30		
	9	10	9	28		
	10	10	10	30		
	9	10	10	29		
	9	10	10	29		
	9	10	10	29		
Jumlah	56	60	59	175		
Nilai rata-rata	9,33	10	9,83			
Jumlah total	158	178	167	503		
Nilai rata-rata total	8,78	9,89	9,28			
Kelompok	1	2	3	4	5	6
Minggu I	28	29	28	21	26	29
Minggu II	27	29	27	29	27	28
Minggu III	30	28	30	29	29	29
Jumlah	85	86	85	79	82	86

Lampiran 5. Analisis Varian F terhadap Titer HA (log 2)
pada Kelompok-kelompok Mencit Perlakuan
dengan Rancangan Petak Terbagi

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{503^2}{54} \\ &= 4685,35 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= 8^2 + 9^2 + 10^2 + \dots + 10^2 - \text{FK} \\ &= 59,65 \end{aligned}$$

JK petak-petak utama

$$\begin{aligned} &= \frac{28^2 + 29^2 + 28^2 + \dots + 29^2}{3} - \text{FK} \\ &= 23,65 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKK} &= \frac{85^2 + 86^2 + 85^2 + \dots + 86^2}{9} - \text{FK} \\ &= 4,32 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_A(\text{Minggu}) &= \frac{161^2 + 167^2 + 175^2}{18} - \text{FK} \\ &= 5,48 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKS}_{(a)} &= \text{JK petak-petak utama} - \text{JKK} - \text{JK}_A \\ &= 23,65 - 4,32 - 5,48 \\ &= 13,85 \end{aligned}$$

$$JK_{B(\text{Jam})}$$

$$= \frac{158^2 + 178^2 + 167^2}{18} - FK$$

$$= 11,15$$

$$JK_{AB} = \frac{49^2 + 60^2 + 52^2 + \dots + 58^2}{6} - FK - JK_A - JK_B$$

$$= 3,19$$

$$JKS_{(b)} = JKT - JK \text{ petak-petak utama} - JK_B - JK_{AB}$$

$$= 59,65 - 23,65 - 11,15 - 3,19$$

$$= 21,66$$

Lanjutan Lampiran 5.

Sidik Keragaman (SK)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F Hitung	F Tabel 0,05 0,01
Kelompok	5	4,32	0,86		
Minggu (faktor A)	2	5,48	2,74	1,97	4,10 7,56
Sisa (a)	10	13,85	1,39		
Jam (faktor B)	2	11,15	5,58	7,75**	3,32 5,39
Interaksi AB	4	3,19	0,80	1,11	2,69 4,02
Sisa (b)	30	21,66	0,72		
Total	53	59,65	12,09		

Lampiran 6. Uji Jarak Berganda Duncan terhadap Titer HA (log 2) pada Berbagai Kelompok Mencit Perlakuan

$$Se = \sqrt{\frac{2 \text{ KTS}(b)}{r \times a}}$$

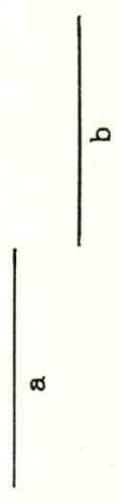
$$= \sqrt{\frac{2 \times 0,72}{6 \times 3}}$$

$$= 0,28$$

$LSR = SSR \times Se$

Perlakuan	\bar{X}	$\bar{X} - A$	$\bar{X} - C$	p	SSR	LSR
B ^a (48 jam)	9,89	1,11*	0,61	3	3,03	0,85
C ^{ab} (72 jam)	9,28	0,50		2	2,89	0,81
A ^b (24 jam)	8,78			1		0,01

9,89 9,28 8,78
 B C A





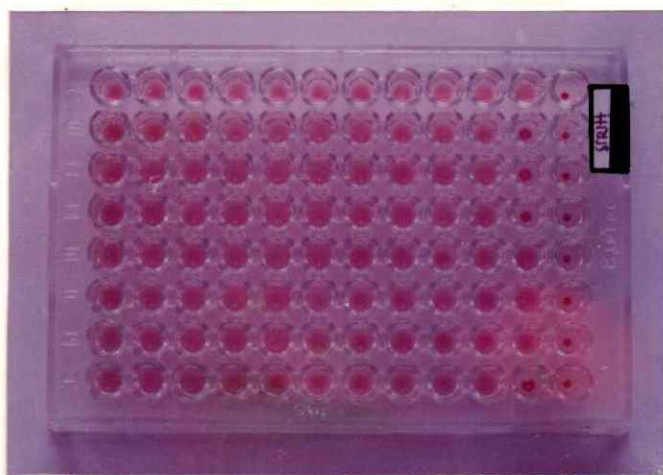
Gambar 7. Pemberian Ekstrak Daun Sirih secara Oral



Gambar 8. Injeksi Sel Darah Merah Domba secara Intra Vena pada Vena Caudalis



Gambar 9. Pengambilan Darah melalui Sinus Retro Supraorbitalis Mencit



Gambar 10. Hasil Pengujian Hemagglutinasasi (HA) Mikrotehnik



Gambar 11. *Challenge* pada Uji Reaksi Hipersensitivitas Tipe Lambat (DTH)



Gambar 12. Pengukuran Penebalan Telapak Kaki Mencit dengan Mikrometer Sekrup



Gambar 13. Rak Kandang Pemeliharaan Hewan Percobaan