

**FRAKSI AIR BUNGA KECUBUNG (*Datura metel* L.) MEMICU  
AKTIVITAS IMUNOKOMPETEN SUBSET SEL T PADA  
MENCIT BALB/c MODEL ASMA**

**SKRIPSI**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

oleh :

**DEWI SATWIKA  
0710913010-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2011**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**FRAKSI AIR BUNGA KECUBUNG (*Datura metel* L.) MEMICU  
AKTIVITAS IMUNOKOMPETEN SUBSET SEL T PADA  
MENCIT BALB/c MODEL ASMA**

oleh :

**DEWI SATWIKA**

**0710913010-91**

**Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada Tanggal 02 Agustus 2011  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Muhaimin Rifa'I, S.Si. Ph.D.Med.Sc.**

**NIP. 19680626 199702 1 001**

**Prof.Dr. Aulanni'am, drh. DES.**

**NIP. 19600903 198802 2 001**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Widodo, S.Si. Ph.D.Med.Sc**

**NIP. 19730811 200003 1 002**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dewi Satwika  
NIM : 0710913010-91  
Jurusan : Biologi  
Penulis Skripsi Berjudul :

**Fraksi Air Bunga Kecubung (*Datura metel* L.) Memicu Aktivitas Imunokompeten Subset Sel T Pada Mencit BALB/c Model Asma**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Skripsi ini. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran

Malang, 02 Agustus 2011  
Yang menyatakan

Dewi Satwika  
0710913010-91

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# FRAKSI AIR BUNGA KECUBUNG (*Datura metel* L.) MEMICU AKTIVITAS IMUNOKOMPETEN SUBSET SEL T PADA MENCIT BALB/c MODEL ASMA

Dewi S<sup>1</sup>., Muhaimin Rifa'i<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>

Jurusan Biologi<sup>1</sup>, Jurusan Kimia<sup>2</sup>, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

## ABSTRAK

Asma terjadi akibat paparan alergen ke dalam saluran pernafasan. Hal ini memicu respon imun yang ditandai oleh proliferasi dan diferensiasi sel-sel naïve, khususnya sel T, serta perubahan gambaran histologi sistem pernafasan. Bunga kecubung dipercaya dapat menyembuhkan asma. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas imunokompeten subset sel T pasca pemberian fraksi air bunga kecubung pada mencit model asma, dosis optimum fraksi air bunga kecubung dan adanya perbaikan gambaran histologi bronkiolus serta hati pasca pemberian fraksi air bunga kecubung. Sensitisasi alergi pada mencit model asma dilakukan melalui injeksi Ovalbumin (OVA) 10µg/ml dan inhalasi OVA 1 mg/ml dalam PBS steril. Jumlah relatif dan absolut subset sel T diukur menggunakan BD FACSCalibur™ *Flowcytometer*. Histopatologi bronkiolus dan hati diamati melalui preparat histologi pewarnaan HE. Data dianalisis menggunakan *One-way* ANOVA ( $p < 0.05$ ) dan uji Tukey menggunakan SPSS 16 for Windows. Fraksi air bunga kecubung memicu aktivitas imunokompeten mencit model asma. Hal ini diketahui melalui peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 42.43% (dosis 0.56mg/kg BB) dan 27.10% (dosis 1.12mg/kg BB). Jumlah sel T CD4<sup>+</sup> menurun 12.06% (dosis 0.56mg/kg BB) dan 22.86% (dosis 1.12mg/kg BB), sedangkan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> menurun signifikan 23.36% (dosis 0.56mg/kg BB). Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> menurun tidak signifikan 20.23% (dosis 0.56mg/kg BB), namun signifikan pada dosis 1.12mg/kg BB (8.87%). Variasi dosis fraksi air bunga kecubung tidak signifikan, dan dosis optimum fraksi air bunga kecubung untuk terapi asma adalah 0.56mg/kg BB. Fraksi air bunga kecubung mengurangi penebalan otot polos bronkiolus, namun menimbulkan nukleus pyknotic pada sel hepatosit dan infiltrasi sel mononuklear pada struktur jaringan hati.

Kata kunci: Asma, fraksi air, histopatologi, kecubung, subset sel T.

# **WATER FRACTION OF KECUBUNG FLOWERS (*Datura metel* L.) INDUCE ACTIVITY OF IMMUNOCOMPETENT T CELL SUBSETS IN MICE BALB/c MODEL ASTHMA**

Dewi S<sup>1</sup>., Muhaimin Rifa'i<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>)Biology Departement, (<sup>2</sup>) Chemistry Departement, Mathematics and Natural Sciences Faculty, Brawijaya University, Malang, 2011.

## **ABSTRACT**

Asthma caused by exposure of allergens into the respiratory tract. Its could triggers an immune response that was characterized by the proliferation and differentiation of naive cells, particularly T cells, as well as histological changes in the respiratory system. Kecubung flowers was believed to cure asthma. The aim of this study was to determine the activity of immunocompetent T cell subset post oral administration of kecubung flowers water fraction in mice models asthma, the optimum dose of Kecubung flowers water fraction and bronchial histological improvement post-administration of Kecubung flowers water fraction. Allergic sensitization in mice models of asthma by injection of ovalbumin 10µg/ml OVA and inhalation 1 mg/ ml OVA in sterile PBS. The relative and absolute number of T cell subset was measured using BD FACS Calibur™ Flowcytometer. Bronchioles and liver histopathology were observed through HE staining. Data were analyzed using One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey test using SPSS 16 for Windows. Kecubung flowers water fraction triggers the activity immunocompetent T cells in mice model of asthma. The result indicated an increasing numbers of CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells 42.43% (dose 0.56mg/kg BW) and 27.10% (dose 1.12mg/kg BW). The number of CD4<sup>+</sup> T cells decreased 12.06% (dose 0.56mg/kg BW) and 22.86% (dose 1.12mg/kg BW), while the number of CD8<sup>+</sup> T cells decreased significantly at 23.36% (dose 0.56mg/kg BW). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells was decrease not significant to 20.23%, (dose 0.56mg/kg BW), but significant at dose of 1.12mg/kg BB (8.87%). Dose variations in the kecubung flowers water fraction are not significant, and the optimum dose of Kecubung flowers water fraction for asthma therapy was 0.56mg/kg BW. Kecubung flowers water fraction reduced the thickness of bronchial smooth muscle, but caused nucleus pyknotic in hepatocytes cells and mononuclear cell infiltration in the liver tissue structure.

Key word: Asthma, water fraction, histopathology, kecubung, subsets T cell.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi sebagai salah satu persyaratan untuk meraih gelar Sarjana S1 di Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya.

Dengan segala hormat dan kerendahan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak **Muhaimin Rifa’i S.Si, Ph.D.Med.Sc** dan Ibu **Prof. Dr. drh. Aulanni’am DES.** selaku Dosen Pembimbing, atas bimbingan, kesabaran, dedikasi dan motivasinya kepada penulis.
2. Bapak **Widodo, S.Si, Ph.D.Med.Sc**, bapak **Dr. Agung Pramana W. Mahendra, M.Si** dan bapak **Dr.Ir. Moch. Sasmito Djati., MS** selaku Penguji, atas berbagai saran dan nasihat yang mendukung penelitian penulis.
3. Ibu **Dra. Fatchiyah, M.Kes.,Ph.D.** dan Bapak **Muhaimin Rifa’i S.Si, Ph.D.Med.Sc** selaku penasihat akademik, atas bimbingan, strategi dan pelajaran untuk mengambil keputusan selama masa perkuliahan dan menempuh skripsi.
4. Mbak **Susiati S.Si.**, Bapak **Harmaji**, dan Mbak **Fatma Ayatiliulil Albab S.Si** serta seluruh rekan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, atas bantuan dan saran teknis selama pengerjaan skripsi dan kesempatan aktualisasi diri.
5. **Papa, Mama, Mbak Icha, Mas Enda** dan Bapak **Tohari** dan seluruh keluarga besar penulis atas dukungan, doa, semangat hidup dan motivasi selama menempuh studi perkuliahan hingga skripsi.
6. Teman-teman **Quorum Sensing 2007** dan seluruh **sahabat** atas seluruh dukungan dan semangat selama menempuh perkuliahan dan skripsi.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Manfaat.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Sensitisasi Alergi .....	5
2.2 Patomekanisme Asma .....	7
2.3 Peran Ovalbumin dalam Induksi Asma .....	8
2.4 Peran Subset Sel T dalam Patomekanisme Asma.....	9
2.5 Kecubung ( <i>Datura metel</i> Linn.) .....	12
2.6 Struktur Histologi Saluran Pernafasan .....	15
2.7 Struktur Histologi Hati .....	16
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>18</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	18
3.2 Prosedur Kerja Penelitian .....	18
3.2.1 Deskripsi Hewan Coba dan Estimasi Besar Sampel.....	18
3.2.2 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan.....	18
3.2.3 Sensitisasi Alergi.....	18
3.2.4 Penentuan Dosis Ekstrak Bunga Kecubung .....	19

3.2.5 Ekstraksi dan Sonde Ekstraksi Bunga Kecubung pada Mencit ....	19
3.2.6 Preparasi Sel Sebelum <i>Flowcytometry</i> Organ <i>Spleen</i> .....	20
3.2.7 Penghitungan Sel Menggunakan <i>Haemocytometer</i> .....	20
3.2.8 Analisis Perubahan Jumlah Subset Sel T Menggunakan <i>Flowcytometry</i> .....	20
3.2.9 Pembuatan Preparat Bronkiolus dan Hati, serta Pengamatan Histopatologi dengan Pewarnaan Hematoksilen-Eosin .....	21
3.2.10 Analisis Data .....	21
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	22
4.1 Analisis Jumlah Total Sel CD4 <sup>+</sup> dan CD8 <sup>+</sup> Menggunakan <i>Flowcytometry</i> .....	22
4.2 Analisis Jumlah Total Sel CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Menggunakan <i>Flowcytometry</i> .....	27
4.3 Analisis Jumlah Total Sel CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Menggunakan <i>Flowcytometry</i> .....	30
4.4 Analisis Histopatologi Jaringan Bronkiolus Pasca Pemberian Fraksi Bunga Kecubung ( <i>Datura metel L.</i> ) .....	33
4.5 Analisis Histopatologi Hati Pasca Pemberian Fraksi Bunga Kecubung ( <i>Datura metel L.</i> ).....	39
<b>BAB V PENUTUP</b> .....	42
5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran.....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	43
<b>LAMPIRAN</b> .....	48

## DAFTAR GAMBAR

### Teks

Gambar 2.1 Representasi Skematis Patomekanisme Asma Alergi.....	7
Gambar 2.2 Bunga kecubung ( <i>Datura metel L.</i> ) .....	14
Gambar 2.3 Struktur Histologi Bronkiolus pada Paru-Paru .....	15
Gambar 2.4 Struktur Histologi Hati .....	17
Gambar 4.1 Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	22
Gambar 4.2 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> dan CD8 <sup>+</sup> pada Setiap Perlakuan Hasil Analisa <i>Flowcytometry</i> .....	24
Gambar 4.3 Jumlah Relatif Sel T CD8 <sup>+</sup> .....	25
Gambar 4.4 Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> pada Setiap Perlakuan Hasil Analisa <i>Flowcytometry</i> .....	28
Gambar 4.5 Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> .....	29
Gambar 4.6 Perubahan Jumlah Sel T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	31
Gambar 4.7 Persentase Jumlah Relatif sel T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> pada Setiap Mencit Perlakuan Hasil Analisa <i>Flowcytometry</i> ...32	
Gambar 4.8 Struktur Histologi Bronkiolus.....	34
Gambar 4.9. Peran Reseptor Muscarinic Dalam Saluran Pernafasan.....	36
Gambar 4.10 Mekanisme Penyembuhan Asma.....	37
Gambar 4.11 Struktur Histologi Hati. ....	40

### Lampiran

Gambar L3.1 Kerangka Operasional Penelitian .....	50
Gambar L6.1 Ilustrasi Inhalasi Ovalbumin .....	53
Gambar L14.1 Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> pada <i>Spleen</i> .....	64
Gambar L16.1 Jumlah Absolut Sel T CD8 <sup>+</sup> pada <i>Spleen</i> .....	67
Gambar L18.1 Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> pada <i>Spleen</i> .....	70
Gambar L20.1 Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> pada <i>Spleen</i> .....	73

## DAFTAR TABEL

### Teks

Tabel 3.1 Rancangan Kelompok Penelitian.....	18
--	----

### Lampiran

Tabel L4.1 Komposisi bahan <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) .....	51
Tabel L4.2 Komposisi bahan <i>Paraformaldehyde</i> (PFA).....	51
Tabel L8.1. Konversi Dosis (Laurench dan Bacharach).....	56
Tabel L13.1. Hasil Uji ANOVA untuk Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	62
Tabel L13.2. Hasil Uji Tukey untuk Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	62
Tabel L14.1. Hasil Uji ANOVA untuk Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	63
Tabel L14.2. Hasil Uji Tukey HSD untuk Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> .....	63
Tabel L15.1. Hasil Analisis ANOVA untuk Jumlah Relatif Sel T CD8 <sup>+</sup> .....	65
Tabel L15.2. Hasil Analisis Tukey HSD untuk Jumlah Relatif Sel T CD8 <sup>+</sup> .....	65
Tabel L16.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Absolut Sel T CD8 <sup>+</sup> .....	66
Tabel L16.2. Hasil Uji Tukey Jumlah Absolut Sel T CD8 <sup>+</sup> .....	66
Tabel L17.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> .....	68
Tabel L17.2. Hasil Analisis Tukey HSD Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> .....	68
Tabel L18.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> .....	69
Tabel L18.2. Hasil Analisis Tukey HSD Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> .....	69
Tabel L19.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	71
Tabel 19.2 Hasil Analisis Uji Tukey Jumlah Relatif Sel T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	71
Tabel L20.1. Hasil Analisis Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	72
Tabel L20.2. Hasil Analisis Uji Tukey Jumlah Absolut Sel T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	72

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Ethik.....	48
Lampiran 2. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman.....	49
Lampiran 3. Kerangka operasional.....	50
Lampiran 4. Komposisi larutan.....	51
Lampiran 5. Injeksi Ovalbumin.....	52
Lampiran 6. Inhalasi Ovalbumin dosis 1mg/ml.....	53
Lampiran 7. Persiapan fraksi air bunga kecubung.....	55
Lampiran 8. Tabel konversi dosis.....	56
Lampiran 9. Penghitungan konsentrasi cekok bunga kecubung.....	57
Lampiran 10. Isolasi <i>spleen</i> dan penghitungan sel hidup.....	58
Lampiran 11. Analisa <i>Flowcytometry</i> .....	59
Lampiran 12. Pembuatan preparat dengan pewarnaan HE.....	60
Lampiran 13. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD4 <sup>+</sup> Relatif.....	62
Lampiran 14. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD4 <sup>+</sup> Absolut.....	63
Lampiran 15. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD8 <sup>+</sup> Relatif.....	65
Lampiran 16. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD8 <sup>+</sup> Absolut.....	66
Lampiran 17. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Relatif.....	68
Lampiran 18. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Absolut.....	69
Lampiran 19. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Relatif.....	71
Lampiran 20. Hasil analisa ANOVA dan uji Tukey CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Absolut.....	72

## DAFTAR ISTILAH

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ACh	<i>Acetylcholine</i>
AHR	<i>Airway Hiperreactivity</i>
AlOH <sub>3</sub>	Aluminium hidroksida
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
CAMP	<i>Cyclic AMP</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
ChAT	<i>Choline Acetyltransferase</i>
DTH	<i>Delayed Type Hypersensitivity</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Foxp3	<i>Forkhead P3</i>
HE	Hematoksilen Eosin
HSD	<i>High Significant Difference</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IgE	<i>Imunoglobulin E</i>
IL	<i>Interleukin</i>
L-selectin	<i>Leukocyte-selectin (adhesion molecule)</i>
M	Muscarinic
M <sub>2</sub>	Muscarinic type-2
M <sub>3</sub>	Muscarinic type-3
mAChRs	<i>Muscarinic acetylcholine receptor</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility</i>
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
Tc	<i>T cytotoxic</i>
Th	<i>T helper</i>
VLA	<i>Very Late Action Antigen</i>

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Asma merupakan penyakit inflamasi kronik saluran pernafasan akibat penyempitan saluran udara. Asma merupakan salah satu manifestasi alergi (hiperreaktivitas tipe I) karena penderita asma merespon substansi asing (alergen) yang masuk ke dalam tubuh secara berlebihan. Alergen menyebabkan peningkatan hiperreaktivitas jalan nafas yang menimbulkan gejala episodik berulang. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan 100-150 juta orang di dunia adalah penderita asma, dan meningkat 180 ribu orang setiap tahun. Sedangkan di Indonesia, 2-5% penduduk menderita asma. Prevalensi asma dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain umur penderita, jenis kelamin, alergi, keturunan, dan lingkungan (Iskandar, 2006).

Asma ditandai dengan adanya inflamasi saluran pernafasan akibat aktivitas eosinofil dan sel limfosit T CD4<sup>+</sup> dalam jumlah besar. Sel-sel T CD4<sup>+</sup> yang menjadi sel efektor dalam pasien asma, memproduksi sitokin antara lain IL-4, IL-5, dan IL-13. Sel tersebut dikenal sebagai sel T *helper* yang berperan penting dalam kejadian asma. Sekresi sitokin pro-inflamasi memicu diferensiasi dan pengerahan eosinofil, sel mast, basofil serta produksi IgE oleh sel B. Reaksi ini secara langsung menginduksi terjadinya hiperreaktivitas tipe I (Akbari, *et al.*, 2006). Respon imun melalui IgE pada permukaan sel mast dan basofil juga menginduksi pengeluaran histamin atau mediator lainnya yang mengakibatkan terjadinya inflamasi dan perubahan gambaran histologi saluran nafas penderita asma.

Sel T CD4 merupakan sel yang bertanggung jawab terhadap adanya alergen yang masuk ke dalam tubuh. Paparan alergen menyebabkan sel T naïve teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi subset sel T yang mengekspresikan molekul permukaan tertentu, sehingga memiliki peran yang spesifik. Aktivasi sel T naïve menjadi subset sel T ditandai dengan tidak terekspresinya molekul permukaan CD62L. Sedangkan subset sel T CD4 yang berfungsi sebagai regulator aktivasi sel, mengekspresikan molekul permukaan CD25 dan faktor transkripsi *Forkhead box P3* (Foxp3). Peran sel T regulator dalam patomekanisme penyakit alergi dan atopi belum dijelaskan secara detail hingga saat ini. Individu yang menderita kekurangan sel T regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)

memiliki level IgE yang tinggi dan mengalami eosinofilia. Beberapa penelitian menunjukkan jumlah sel T regulator yang rendah atau adanya perubahan jumlah sel T regulator pada pasien alergi (Lee dkk, 2006). Fungsi sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sebagai regulator ditentukan oleh ekspresi faktor transkripsi Foxp3. Sedangkan sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> yang tidak mengekspresikan Foxp3, bertindak sebagai sel konvensional, yang jika terpapar alergen, menjadikannya sel efektor.

Kecubung (*Datura metel* Linn.) dikenal masyarakat sebagai tanaman yang memiliki banyak manfaat, tetapi juga menimbulkan banyak kerugian. Selain dapat menyembuhkan berbagai penyakit, penggunaan kecubung dalam dosis tinggi menyebabkan berbagai dampak buruk bagi keselamatan manusia. Salah satu potensi bunga kecubung adalah sebagai alternatif penyembuhan asma. Kandungan alkaloid dalam bunga kecubung dipercaya sebagai senyawa yang berperan dalam penyembuhan asma. Penggunaan kecubung sebagai terapi penyembuhan asma di Indonesia dilakukan dengan cara mencampur kecubung kering dengan klobot dan dihisap sebagai rokok. Berdasarkan hasil penelitian Etnobotani di Kamerun, diketahui bahwa kecubung yang dikeringkan dan diseduh menggunakan air panas dapat menyembuhkan asma (Noumi, 2009). Beberapa penelitian melaporkan bahwa kecubung adalah tanaman beracun bagi manusia dan hewan jika dikonsumsi dalam dosis tinggi, sehingga dosis penggunaan kecubung menjadi penting untuk diperhatikan (Okwu dan Igara, 2009).

Pengobatan penyakit asma melalui herbal, merupakan alternatif dalam penanganan asma, disamping obat-obatan kimiawi. Herbal dipilih karena cenderung memiliki efek samping lebih ringan jika digunakan sebagai terapi penyembuhan penyakit. Selain itu, herbal memiliki potensi menjadi imunomodulator. Imunomodulator merupakan istilah yang diberikan pada bahan yang dapat memodulasi sistem imun tubuh, sehingga mampu melawan serangan antigen. Berdasarkan hasil penelitian menggunakan herbal, menunjukkan bahwa minyak biji jinten hitam dapat menurunkan derajat inflamasi saluran pernafasan sebanding dengan penggunaan antihistamin sebagai obat modern (Subiyanto dan Diding, 2008). Tetapi, tingkat keefektifan dan keamanan herbal belum seluruhnya terjamin. Hal ini disebabkan penggunaan herbal sebagai terapi belum seluruhnya didukung oleh uji-uji empiris dan observasi ilmiah tentang khasiat dan efek samping herbal tersebut. Sehingga dalam praktek di masyarakat, dosis tanaman herbal yang digunakan hanya berdasarkan

estimasi (pendugaan). Oleh karena itu, dibutuhkan suatu penelitian tentang herbal yang dipercaya sebagai terapi penyembuhan asma yang efektif dan tidak berdampak buruk bagi kesehatan.

Pengolahan herbal menjadi jamu dilakukan secara sederhana, yaitu dengan merebus atau menyeduh herbal ke dalam air panas, sehingga diperoleh *crude extract* dari tanaman tersebut. Air dalam Farmakope Indonesia, ditetapkan sebagai salah satu cairan penyari. Air dapat melarutkan garam alkaloid, glikosida, tanin dan gula (Ningtyas, 2008). Oleh karena itu, peneliti menggunakan fraksi air sebagai metode untuk memperoleh *crude extract* bunga kecubung. Fraksi air bunga kecubung pada mencit model asma diharapkan dapat menjadi salah satu uji empiris pemanfaatan bunga kecubung sebagai terapi asma.

## 1.2 Rumusan Permasalahan

Berdasarkan latar belakang tersebut maka masalah yang akan dikaji pada penelitian ini adalah :

1. Apakah fraksi air bunga kecubung memicu aktivitas imunokompeten pada mencit BALB/c model asma berdasarkan perubahan kuantitas jumlah subset sel T?
2. Berapakah dosis optimum fraksi air bunga kecubung dalam menyembuhkan asma pada mencit BALB/c model asma berdasarkan perubahan kuantitas jumlah subset sel T?
3. Apakah pemberian fraksi air bunga kecubung dapat memperbaiki gambaran histopatologis bronkiolus mencit BALB/c model asma?
4. Apakah pemberian fraksi air bunga kecubung dapat menyebabkan toksisitas hepar berdasarkan gambaran histologi hepar mencit BALB/c model asma?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui adanya aktivitas imunomodulator fraksi air bunga kecubung pada mencit BALB/c model asma
2. Mengetahui dosis optimum fraksi air bunga kecubung dalam menyembuhkan asma pada mencit BALB/c model asma?
3. Mengetahui perbaikan gambaran histopatologis bronkiolus mencit BALB/c model asma pasca pemberian fraksi air bunga kecubung.

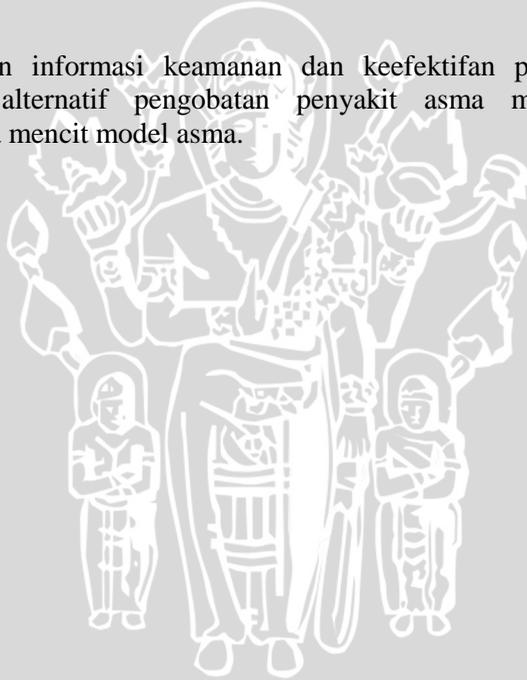
4. Mengetahui efek toksisitas fraksi air bunga kecubung pada mencit BALB/c model asma berdasarkan histopatologi gambaran struktur hati.

#### 1.4 Batasan Masalah

Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik No.59 dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya. Sensitisasi alergen dilakukan melalui injeksi i.p OVA/alum 10 $\mu$ g/ml dan paparan OVA 1mg/ml. Penggunaan tanaman juga telah mendapatkan surat identifikasi tanaman dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Universitas Brawijaya. Perubahan kuantitatif variabel meliputi perubahan jumlah relatif dan absolut subset sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada *spleen* menggunakan metode *flowcytometry*.

#### 1.5 Manfaat

Memberikan informasi keamanan dan keefektifan penggunaan herbal sebagai alternatif pengobatan penyakit asma melalui uji laboratorium pada mencit model asma.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sensitisasi Alergi

Alergi merupakan suatu perubahan reaksi atau respon pertahanan tubuh yang menolak dan tidak tahan terhadap zat-zat yang tidak berbahaya. Reaksi yang ditimbulkan oleh alergi mulai dari serangan bersin, mata berair, ruam merah yang gatal dan panas, hingga serangan asma. Bentuk reaksi klinis alergi berbeda-beda, tergantung pada jenis alergen, rute masuknya alergen dan jaringan yang terlibat. Alergi merupakan salah satu respon imun yang disebut hiperreaktivitas. Reaksi hiperreaktivitas merupakan respon imun yang berbahaya, karena dapat menimbulkan kerusakan jaringan (Rifa'i, 2008).

Sensitisasi alergi berawal ketika individu terpapar dan merespon protein asing (antigen), yang dapat memasuki tubuh melalui kulit, sistem pernafasan dan sistem pencernaan. Sensitisasi diawali oleh sel APC (*Antigen Presenting Cell*), seperti sel dendritik, makrofag dan sel B yang menangkap protein asing dan mengolahnya menjadi fragmen peptida yang lebih kecil. Dampak yang ditimbulkan dengan adanya pengenalan antigen adalah aktivasi, diferensiasi dan perluasan klonal dari berbagai sel, salah satunya sel T CD4<sup>+</sup>. Sel Th2 CD4<sup>+</sup> mengalami perubahan kuantitas dan jenis molekul permukaan. Hal ini memicu produksi dan sekresi berbagai sitokin, diantaranya IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13. Sekresi berbagai sitokin mengakibatkan penerahan sel Th2 dan aktivasi eosinofil dalam kulit, saluran pernafasan dan pencernaan, serta produksi IgE-spesifik alergen oleh limfosit B (Pimentel, 2010).

Reaksi alergi dibagi menjadi fase cepat (*immediate hypersensitivity*) dan fase lambat (*delayed hypersensitivity*). Respon fase cepat disebabkan oleh dampak langsung histamin dan lipid yang masuk pada pembuluh darah dan otot polos. Kedua mediator tersebut dilepas oleh sel mast dalam waktu yang relatif cepat setelah paparan alergen. Respon fase lambat disebabkan oleh adanya pemasukan leukosit besar-besaran yang dirangsang oleh kemokin dan mediator lain dari sel mast selama dan sesudah respon fase cepat (Rifai, 2011). Konsentrasi sel mast dalam berbagai organ target mempengaruhi kekuatan respon. Sel mast mengekspresikan reseptor dengan afinitas ikatan yang tinggi terhadap IgE (FcεRI) (Yasef, 2007). Jumlah sel mast melimpah dalam kulit dan mukosa pada sistem respiratori dan saluran pencernaan, sehingga jaringan

tersebut seringkali menderita luka akibat reaksi fase cepat (Abbas dan Lichtman, 2005).

Asma merupakan penyakit inflamasi kronik saluran napas akibat penyempitan saluran udara. Asma terjadi sebagai respon masuknya rangsangan berupa substansi asing (alergen), seperti serbuk sari, debu, bulu binatang, dan udara dingin. Rangsangan tersebut menyebabkan peningkatan hiperreaktivitas jalan nafas yang menimbulkan gejala episodik berulang berupa mengi (*wheezing*), sesak nafas, dada terasa berat dan batuk-batuk terutama malam menjelang dini hari. Sebanyak 70% kasus asma disebabkan oleh reaksi *immediate hypersensitivity* yang dimediasi oleh antibodi IgE, sedangkan 30% lainnya berhubungan dengan atopi atau dipicu oleh stimulus non-imun, misalnya obat-obatan, udara dingin dan olahraga (Abbas dan Lichtman, 2005). Individu yang memproduksi IgE dan eosinofil lebih tinggi dalam aliran darah dibandingkan dengan individu normal disebut atopi. Individu atopi memiliki kerentanan terhadap penyakit alergi, seperti asma dan alergi serbuk bunga. Kondisi ini dipengaruhi oleh kekerabatan dan lokus gen (Rifa'i, 2011). Meskipun tingkat kerentanan kejadian asma berbeda, namun patomekanisme asma atopi dan non-atopi serupa, yang diakibatkan oleh degranulasi sel-sel mast.

Reaksi hiperreaktivitas dibagi ke dalam 4 tipe reaksi, berdasarkan kecepatan dan mekanisme imun yang terjadi. Reaksi tipe I atau yang disebut sebagai reaksi cepat atau reaksi alergi, timbul segera setelah tubuh terpapar oleh alergen. Reaksi yang terjadi pada asma, merupakan salah satu contoh dari reaksi hiperreaktivitas tipe I. Pada hiperreaktivitas tipe I, alergen yang masuk ke dalam tubuh menimbulkan respon imun berupa produksi IgE dan serangan asma (Baratawidjaja, 2006).

Prosedur terjadinya asma berdasarkan reaksi tipe I adalah sebagai berikut (Kurniawati, 2005):

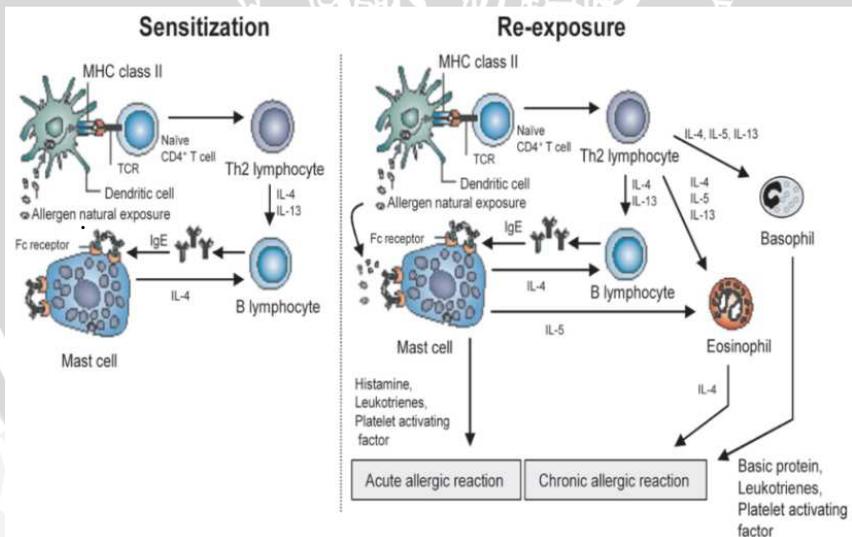
1. **Fase sensitisasi** adalah fase pembentukan immunoglobulin E (IgE) yang terjadi akibat adanya interaksi antara alergen pada limfosit B dengan limfosit T spesifik-alergen. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan sintesa dan produksi immunoglobulin oleh limfosit B dari IgG dan IgM menjadi IgE spesifik allergen. Fase ini berakhir ketika IgE berikatan dengan reseptor permukaan sel mast, yaitu (Fcε-R1).
2. **Fase aktivasi** adalah waktu yang dibutuhkan untuk paparan ulang dengan alergen yang sama, sehingga sel mast melepas mediator

berisikan granul yang menimbulkan berbagai reaksi. Ikatan alergen-IgE pada sel mast/basofil merangsang pembentukan granul-granul dalam sitoplasma dan adanya degranulasi memicu pengeluaran mediator kimiawi: histamin, serotonin, SRSA, ECFA, dan bradikinin. Dampak pengeluaran mediator kimiawi termasuk ke dalam fase efektor.

3. **Fase efektor**, adalah waktu terjadi respons yang kompleks (anafilaksis) sebagai akibat mediator-mediator yang dilepas sel mast. Dampak pengeluaran mediator kimiawi antara lain spasme bronkus, peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan sekresi mukus berlebihan. Seluruh dampak tersebut mengakibatkan penyempitan saluran pernafasan dan menimbulkan gejala asma.

## 2.2. Patomekanisme Asma

Asma dikenali sebagai penyakit kronis inflamatori pada saluran pernafasan yang dipengaruhi oleh peran beberapa sel, misalnya sel mast, eosinofil, limfosit B dan T serta sel-sel epitelial. Penyakit ini ditandai oleh gangguan aliran pernafasan secara berulang, hiperreaktivitas saluran pernafasan yang disebabkan oleh stimuli spesifik maupun non-spesifik, inflamasi kronis saluran pernafasan dan perubahan bentuk aliran pernafasan (Yasef, 2007).



Gambar 2.1. Representasi Skematis Patomekanisme Asma Alergi (Yasef, 2007).

Konsep patomekanisme asma alergi diawali oleh sensitivitas alergen lingkungan yang dapat terjadi beberapa tahun sebelum munculnya serangan klinis asma. Sensitivitas alergen dibawa dan diproses oleh *antigen presenting cell* (APC), seperti sel dendritik dan dipresentasikan pada sel-sel T spesifik alergen yang akan memicu produksi sitokin inflamatori, seperti IL-4 dan IL-3. Sekresi sitokin pro-inflamasi menstimulasi sel-sel B spesifik alergen untuk berproliferasi dan menghasilkan IgE melalui sel plasma. IgE merupakan immunoglobulin yang bekerja spesifik terhadap reaksi alergi. Sintesis IgE diinduksi oleh paparan terhadap antigen dan sitokin Th2, khususnya IL-4. IgE selanjutnya berikatan dengan reseptor FcεRI sel-sel mast (Abbas dan Lichtman, 2005).

Pada pemaparan kedua, alergen akan berikatan pada IgE terikat pada permukaan sel-sel mast, sehingga adanya kompleks ikatan IgE-FcεRI menyebabkan terjadinya pengeluaran mediator inflamatori seperti histamin dan beberapa mediator inflamatori lainnya. Mediator derivat sel mast (histamin) selanjutnya memodulasi reaksi awal asma yang dikarakteristikan seperti konstiksi otot polos saluran pernafasan, kebocoran pembuluh darah yang luas, hipersekresi mukus, meningkatnya kemampuan reaksi saluran pernafasan, dan terjadinya inflamasi sel. Jadi, berbagai gejala dapat berhubungan dalam inisiasi terjadinya inflamasi alergi saluran pernafasan, yang menyebabkan penyakit inflamasi kronis saluran pernafasan (Abbas dan Lichtman, 2005).

### **2.3. Peran Ovalbumin dalam Induksi Asma**

Alergen merupakan bahan yang dapat menimbulkan reaksi alergi pada individu yang sensitif terhadap bahan tersebut. Sifat alergen, dosis alergen, rute masuk alergen ke dalam tubuh serta lokasi terjadinya respon alergi menentukan jenis sel yang berperan dan alergi yang ditimbulkan. Sel T CD4 naive yang merespon peptida yang dipresentasikan oleh sel dendritik akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 atau Th2 bergantung pada lingkungannya, baik sebelum maupun selama terjadinya respon (Rifa'i, 2011). Pada individu atopi, inhalasi alergen cenderung menginduksi perkembangan Th2, sedangkan pada individu non-atopi respon Th1 lebih dominan (Pimentel, 2010).

Ovalbumin (OVA) sebagai protein yang dapat merangsang pembentukan respon imun ke arah Th2 dominan yang dapat diberikan secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal. Terdapat beberapa kriteria yang menentukan bahwa suatu protein memiliki peran sebagai alergen

inhalasi yang mengaktifkan Th2 dalam memicu perkembangan IgE, diantaranya protein tersebut harus menimbulkan respon pada sel T dan memiliki peptida yang dapat berikatan dengan MHC kelas II (Rifa'i, 2011). Sensitisasi OVA baik secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah Th2. OVA merupakan protein utama yang berasal dari putih telur ayam berupa glikoprotein dengan berat molekul 45.000 dalton. OVA adalah alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi tipe I pada manusia (Nurhayati, *et al.*, 2003).

Alergen umumnya diaplikasikan sebagai larutan cair atau dilarutkan dalam adjuvan, salah satunya adalah aluminium hidroksida (Al(OH)<sub>3</sub>). Adjuvan adalah substansi yang meningkatkan aktivasi sel T dengan menyebabkan akumulasi dan lokalisasi antigen, serta mengaktifkan limfosit dan sitokin pada situs antigen terlokalisasi (Albab, 2009). Al(OH)<sub>3</sub> dikenal sebagai agen potensial yang menginduksi Th2 dan menstimulasi sintesis IgE (Oosterhout, *et al.*, 1998).

#### **2.4. Peran Subset Sel T dalam Patomekanisme Asma**

Sel-sel T CD4<sup>+</sup> memiliki peranan krusial dalam mengendalikan inflamasi pada penyakit asma. CD4<sup>+</sup> merupakan populasi limfosit T utama yang menginfiltrasi saluran pernafasan dalam kasus asma dan teraktivasi pada saluran pernafasan, CD4<sup>+</sup> mengekspresikan molekul permukaan kelas II antigen *histocompatibility* (HLA-DR), CD25 (IL-2R) dan VLA 1 (*Very Late Action Antigen 1*). Sel T CD4<sup>+</sup> naive berdiferensiasi menjadi subset yang khusus seperti Th1 dan Th2 sebagai respon terhadap antigen, ko-stimuli dan sitokin. Sitokin yang diproduksi respon imun non spesifik terhadap mikroba atau respon imun spesifik yang dini mempengaruhi diferensiasi sel T CD4<sup>+</sup> naive ke Th1, sedangkan sitokin diproduksi sebagai respon imun terhadap antigen spesifik, mempengaruhi diferensiasi sel T CD4 naive menjadi Th2 (Campbell, *et al.*, 2004). Sel T CD4<sup>+</sup> tipe Th1 mensekresi IL-2 dan IFN- $\gamma$  (*Interferon  $\gamma$* ) dan terlibat dalam respon imun sel melawan invasi patogen intraseluler, seperti virus. Sedangkan sel T CD4<sup>+</sup> Th2 memproduksi sitokin IL-4, IL-5, dan IL-13 yang terlibat dalam respon imun melawan antigen ekstraseluler (Yasef, 2007).

Produksi IgE oleh sel B dipengaruhi adanya sekresi IL-4 oleh sel mast. Sel mast memiliki ligan CD40 yang akan berikatan dengan reseptor CD40 pada permukaan sel B. Sel mast yang teraktivasi akibat ikatan silang IgE dan alergen pada permukaan sel mast, akan mengekspresikan

ligan CD40 dan mensekresi IL-4. Ikatan IL-4 pada reseptor sel B menimbulkan *class switching* yang mengarah pada pembentukan IgE (Rifa'i, 2011). IL-4 juga merupakan sitokin autokrin untuk pertumbuhan dan diferensiasi Th2 (Baratawidjaja, 2006). CD4<sup>+</sup> terdapat pada permukaan sel T *helper* dan memiliki afinitas ikatan yang tinggi terhadap molekul MHC klas II. Interaksi antara CD4 dan MHC klas II membantu mempertahankan sel T *helper* dan sel APC (*Antigen Presenting Cell*) tetap menyatu. Sedangkan interaksi antara sel APC dan sel T sitotoksik (Tc) ditingkatkan oleh kehadiran molekul permukaan CD8. Molekul permukaan ini sebagian besar terdapat pada permukaan sel T sitotoksik, dan memiliki afinitas ikatan terhadap molekul MHC klas I. Interaksi antara molekul MHC klas I dan CD8 membantu mempertahankan kedua sel itu tetap menyatu (Campbell, *et al.*, 2004).

Paparan ulang antigen yang masuk ke dalam tubuh, menyebabkan sel T naïve teraktivasi dan berubah menjadi sel memori, sel T regulator atau jenis sel efektor lainnya. Kondisi ini menyebabkan jumlah sel T naïve berkurang. CD62L merupakan marker aktivasi sel, sehingga perubahan jumlah sel T naïve menjadi sel yang teraktivasi dapat dideteksi melalui adanya ekspresi molekul permukaan tersebut. Pada mencit sehat, jumlah sel T yang mengekspresikan CD62L tinggi, sedangkan pada mencit yang tersensitisasi alergen, jumlahnya menurun (Baratawidjaja, 2006). CD62L merupakan molekul permukaan sel yang bertugas dalam *homing* sel T naïve menuju organ limfoid perifer dan mengantarkan sel-sel T efektor menuju ke tempat inflamasi. Terdapat 3 molekul selektin yang dikenal, yaitu L (CD62L), P (CD62P) dan E (CD62E) (Tedder, *et al.*, 1995).

CD62L diekspresikan pada seluruh leukosit, limfosit T, makrofag, neutrofil dan monosit serta meregulasi migrasi sel tersebut menuju inflamasi dan *homing* sel T naïve menuju ke *lymph node* perifer. Sedangkan CD62P dan CD62E diekspresikan pada permukaan, yang mengikat leukosit, dan memediasi akumulasi neutrofil dan monosit pada tempat inflamasi (Johnson, *et al.*, 1995). Penelitian terdahulu yang menggunakan mencit defisiensi CD62L melaporkan bahwa CD62L berperan sebagai bagian penting dalam membangkitkan respon sel T primer, respon *delayed type hypersensitivity* (DTH), dan migrasi neutrofil menuju ke tempat reaksi DTH (Greewall, 2001). L selektin (CD62L) merupakan pengikat awal dari leukosit menuju endotelium dan secara

cepat terlepas setelah aktivasi neutrofil oleh pembelahan proteolitik (Mann, 2006).

Sel T naive yang telah teraktivasi dan kehilangan ekspresi CD62L pada permukaan sel, akan berubah menjadi sel yang memiliki peran tertentu, misalnya menjadi sel T regulator atau sel T efektor. Sel T dari populasi CD4 yang mengekspresikan molekul permukaan CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) dapat bertindak sebagai sel T efektor atau sel T regulator. Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bertindak sebagai regulator karena sel ini mampu mengendalikan atau meregulasi aktivitas sel imun lain. Sifat regulasi dan fungsi supresi tergantung pada ekspresi Foxp3. Sel T regulator berfungsi sebagai sel *suppressor* yang memiliki arti penting dalam mencegah terjadinya inflamasi (Rifa'i, 2008). Sel T regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) merupakan fraksi minor dalam populasi sel T CD4<sup>+</sup> yaitu 5-10% dari seluruh populasi sel T CD4<sup>+</sup>. Sel T regulator berperan dalam mencegah autoimun spesifik-organ, penolakan *allograft* dan menjaga *self-tolerance*. Sel lain yang mengekspresikan CD25 pada rantai  $\alpha$  pada level yang tinggi dalam reseptor IL-2 (CD25) yang dihasilkan oleh timus sebagai subpopulasi sel T matang secara fungsional dan berperan sebagai sel efektor (Lee, *et al.*, 2006).

Sel T regulator mengekspresikan faktor transkripsi gen yaitu *Forkhead box P3* (Foxp3) yang muncul menjadi gen pengontrol perkembangan sel T regulator. Sifat regulasi dan fungsi supresi tergantung pada ekspresi Foxp3. Sel T CD4<sup>+</sup> tanpa molekul permukaan yang mengekspresikan CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) menyebabkan aktivasi berbagai sel yang memicu keluarnya sitokin, sehingga sitokin dalam tubuh akan meningkat dan terjadi berbagai inflamasi. Bahkan, sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> yang tidak mengekspresikan Foxp3, bertindak sebagai sel konvensional, yang jika terpapar antigen, akan berfungsi sebagai sel efektor. Sedangkan sel T CD4<sup>+</sup> yang mengekspresikan molekul CD25 pada permukaannya atau CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, akan meregulasi jumlah sel yang teraktivasi, sehingga pengeluaran sitokin dapat terkendali dan mencegah terjadinya inflamasi. Ekspresi Foxp3 dalam sel T non-regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) dapat merubah sel T non-regulator menjadi sel T regulator (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), sehingga sel tersebut memiliki kemampuan untuk meregulasi aktivasi sel lain (Lee, *et al.*, 2006). Perubahan tersebut dapat terjadi jika CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> mengalami suatu aktivasi oleh stimuli yang sesuai (Rifa'i, 2008).

Peran T regulator dalam patomekanisme penyakit alergi dan atopi belum dijelaskan secara detail hingga saat ini. Tetapi, Menurut Yasef (2007), tidak adanya perkembangan sel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> pada mencit mutan mengakibatkan gejala autoimun *lymphoproliferative*. Mencit mutan tersebut memiliki kadar IgE dan eosinofilia yang tinggi. Pasien yang kekurangan sel T reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (pasien penderita disregulasi imun, *polyendocrinopathy, enteropathy* atau *X-linked syndrome*, sindrom yang disebabkan oleh mutasi Foxp3) memperparah eczema, meningkatkan level IgE, eosinofilia dan menderita alergi makanan. Mekanisme aksi sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sebagai sel T regulator diduga memblokir transisi dari tahapan awal aktivasi menjadi sel Th2, membatasi inflamasi saluran pernafasan, dan berperan dalam mencegah respon Th2 yang menyimpang terhadap alergen lingkungan. Mekanisme regulasi imunitas sel T regulator dan dampaknya terhadap sel T teraktivasi lainnya hingga kini belum jelas, namun mekanisme sel T regulator melibatkan peran penting sitokin, interaksi antar sel, modifikasi APC oleh sel T regulator dan kompetisi dengan sel T naïve untuk ketegangan menanggapi antigen yang sama dalam adhesi terhadap APC (Lee, *et al.*, 2006).

### **2.5. Kecubung (*Datura metel* L.)**

*Datura metel* Linn. dikenal masyarakat Indonesia sebagai kecubung. Tanaman ini dikenal luas sebagai tanaman beracun tetapi dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Morfologi kecubung yaitu berupa terna tegak, memiliki pangkal batang berkayu dan tinggi 0,5 – 2 m. Batangnya hijau atau keunguan tua. Bunganya berdiri sendiri dengan tangkai sepanjang 1–3 cm dan kelopaknya bertajuk lima. Daun kecil berbentuk rata, sedangkan yang besar melekuk ke dalam. Bunga dan daun dapat digunakan sebagai obat asma. Bunga kecubung digunakan sebagai obat tradisional oleh suku Tionghoa dan di Kamerun sebagai terapi untuk menyembuhkan asma. Berdasarkan hasil penelitian Etnobotani di Kamerun, diketahui bahwa *Datura metel* dimanfaatkan sebagai terapi anti-asma. Aplikasi tanaman ini yaitu mengambil dua genggam daun bunga kecubung, selanjutnya dikeringkan, diseduh dengan satu liter air panas dan diminum sebanyak satu gelas penuh selama satu minggu (Noumi, 2009). Metode aplikasi kecubung sebagai terapi alternatif penyembuh asma di Indonesia yaitu daun kecubung dikeringkan, dicampur dengan klobot jagung dan

digunakan sebagai rokok untuk menyembuhkan asma (Ong dan Nordiana, 1999).

Pribumi Cina, Indian dan Meksiko kuno menggunakan bunga kecubung sebagai salah satu bahan campuran analgesik. Gangguan yang berhubungan dengan sistem saraf pusat atau sistem organ lainnya dapat di terapi menggunakan beberapa bagian tanaman kecubung. Penyakit yang dapat disembuhkan antara lain parkinson, paralysis, gangguan mental, gangguan psikologi dan tidur, epilepsi, sakit kepala, spasma, *shock*, *motion sickness*, asma, tuberkulosis, kanker payudara, glaukoma, arthritis, dan reumatik. Selain berbagai manfaat diatas, halusinasi, gangguan jiwa, disorientasi dengan tingkah laku yang gelisah, tidak jarang ditemukan pada penggunaan yang tidak sepatutnya dari berbagai bagian tanaman tersebut (El-Torki, *et al.*, 2010).

Kecubung mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain 0.3-0.4 % alkaloid (sekitar 85 % *scopolamine* dan 15 % *hyoscyamine*), *hycoscine* dan *norhyoscyamine*, *norscopolamine*, *hydroxy-6-hyoscyamine*, *meteloidine*, atropin, serta beberapa *withanolide* yang memiliki aktivitas toksik (Murch, 2009). *Scopolamine* dan *hyoscyamine* bersifat *anticholinergics*. Keduanya berperan secara kompetitif dan *reversible* menghambat asetilkolin *neuro-transmitter* dari pengikatan pada reseptor *muscarinic* dan sifat antagonis ini mengakibatkan efek seperti *sympathomimetic* dalam organ. Hal ini mengakibatkan peningkatan detak jantung, menginduksi relaksasi, penghambatan pergerakan dalam otot polos, dan menginduksi dilatasi pupil mata (Alexander, *et al.*, 2008). Secara taksonomi, kecubung dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Plantamof, 2010):

Kingdom	:Plantae
Divisi	:Magnoliophyta
Kelas	:Magnoliopsida
Ordo	:Solanales
Famili	:Solanaceae
Genus	: <i>Datura</i>
Spesies	: <i>Datura metel</i> Linn.



Gambar 2.2. Bunga kecubung (*Datura metel* Linn.) (Autumnbelle, 2011).

Seluruh bagian dari tumbuhan kecubung dapat digunakan sebagai bahan pengobatan berbagai penyakit. Daunnya dapat digunakan untuk meringankan dan menenangkan rasa sakit (*cataplasmen*). Merokok dengan menggunakan kecubung pada umumnya dilakukan untuk terapi asma. Umumnya yang digunakan adalah daunnya, bahkan bunga, akar dan bijinya yang telah dikeringkan. Terapi asma menggunakan rokok hasil campuran kecubung dan klobot jagung, dilakukan hingga serangan asma mereda (Backer dan V.Brink, 1965).

Masyarakat Indonesia umumnya mengolah bagian tanaman tertentu menjadi jamu. Jamu merupakan minuman tradisional, berasal dari olahan satu atau berbagai jenis herbal. Jamu pada umumnya berupa herbal yang direbus atau diseduh menggunakan air panas sebagai metode sederhana dalam mengekstraksi bahan kimia. Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang dibuat dengan menyaring simplisia nabati atau hewani dengan cara melepaskan zat aktif dari masing-masing bahan obat menggunakan pelarut yang sesuai (Utami, 2008). Sedangkan ekstraksi merupakan penarikan bahan aktif yang diinginkan dari bahan mentah obat dan menggunakan pelarut yang sesuai, sehingga zat aktif tersebut dapat larut. Simplisia tersebut tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Maserasi merupakan cara penyaringan sederhana. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari merupakan pelarut bahan aktif simplisia nabati, memiliki kriteria murah, mudah di dapat, stabil secara kimia dan fisika, bereaksi netral, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, selektif (menarik zat berkhasiat yang dikehendaki) dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat.

Cairan penyari yang dapat digunakan adalah air, etanol, etanol-air atau eter (Ningtyas, 2008).

Prosedur maserasi dilakukan dengan merendam bahan yang berupa simplisia yang halus dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel atau masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, yang menyebabkan zat aktif tersebut larut. Zat aktif dalam simplisia terlarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel. Larutan yang lebih pekat (di dalam sel) di desak keluar sel, masuk ke dalam larutan di luar sel. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Ningtyas, 2008).

### 2.7. Struktur Histologi Saluran Pernafasan

Sistem pernafasan merupakan organisasi dari kompleks organ dan jaringan yang dibutuhkan untuk pertukaran karbondioksida ( $\text{CO}_2$ ) dan oksigen ( $\text{O}_2$ ). Sistem pernafasan terdiri dari dua paru dan banyak saluran udara dengan berbagai ukuran yang keluar dan masuk paru. Saluran nafas terdiri atas bagian konduksi dan bagian respirasi. Bagian konduksi adalah saluran nafas solid, yang terletak di luar dan di dalam paru yang mengalirkan udara ke dalam paru untuk respirasi. Bagian respirasi adalah saluran nafas di dalam paru tempat berlangsungnya respirasi atau pertukaran gas. Epitel pada jalan nafas di trakea, bronki dan bronkioli lebih besar, yaitu epitel bertingkat semu bersilia dengan banyak sel goblet. Diameter saluran nafas dan ketinggian epitel dalam paru secara progresif mengecil. Hal ini juga terjadi pada jumlah silia dan sel goblet yang makin berkurang. Pertukaran gas hanya terjadi di alveolus, yaitu kantong udara terminal sistem pernafasan (Eroschencko, 2000).



Gambar 2.3. Struktur Histologi Bronkiolus pada Paru-Paru (Slomianka, 2009)

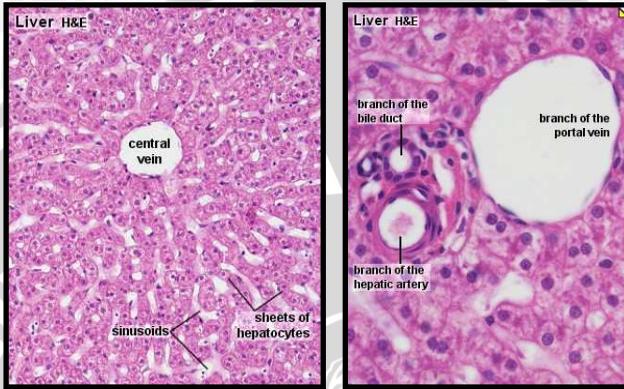
Bronkus dan bronkiolus merupakan saluran yang penting dalam proses pernafasan. Setiap bronkus primer bercabang dua, dengan setiap cabang menjadi lebih kecil secara progresif hingga mencapai diameter 5mm. Selain organisasi kartilage dan otot polos, mukosa pada bronkus strukturnya sama dengan mukosa pada trakea. Tetapi, mukosa pada kartilage bronkus lebih tidak teratur dibandingkan pada trakea. Tekstur histologi bronkus tersusun atas lempeng kartilage yang terletak melingkari lumen. Lapisan epitelium terletak di permukaan dan di bawahnya, terdapat lapisan lamina propria dan otot polos yang mengandung berkas spiral berselang-seling yang menyusun otot polos. Berkas otot polos lebih menonjol di dekat zona pernafasan. Lamina propria kaya serat elastis dan mengandung mukosa yang melimpah, dimana saluran membuka menuju ke lumen. Sejumlah limfosit ditemukan dalam lamina propria dan sel-sel epitel (Junqueira, 2005). Percabangan bronkus terkecil (< 1mm) berhubungan dengan sistem brokiolus.

Bronkus dan bronkiolus merupakan saluran pernafasan yang memiliki tekstur histologi yang berbeda. Perbedaan tersebut terletak pada keberadaan kartilage dan ketebalan otot polos. Bronkiolus tidak memiliki lempeng kartilage seperti pada bronkus, yang berfungsi membantu mempertahankan struktur lumen bronkus. Selain itu, bronkiolus memiliki lapisan otot polos yang lebih tebal dibandingkan bronkus. Tekstur histologi bronkiolus tersebut menjadikan dinding bronkiolus dapat mengerut, sehingga memberikan mekanisme untuk mengatur aliran udara menuju bagian respirasi paru-paru untuk mengadakan pertukaran gas. Sistem saraf berperan dalam sistem pernafasan. Ketika saraf parasimpatis yang mengatur kerja berkas otot polos terangsang, maka otot akan berkontraksi dan dinding bronkiolus mengerut. Sebaliknya, dalam kondisi stimulasi saraf simpatik, bronkiolus melebar atau relaksasi (Visualhistology.com, 2011).

## **2.8. Struktur Histologi Hati**

Hati merupakan kelenjar terbesar dalam tubuh mamalia. Hati memiliki struktur makro dan mikro yang unik. Organ ini menerima darah vena dari saluran gastrointestinal melalui sistem portal hepatis, dimana darah arteri masuk melalui arteri hepatis. Tekstur histologi hati didominasi oleh lobulus dan sinusoid, dengan adanya fagosit aktif yang melimpah (sel Kupffer), pembuluh darah utama dan piringan hepatosit yang berhubungan dekat dengan terminal limfatik dan *bile canaliculi* (El-Torki, *et al.*, 2010). Penampakan tekstur histologi yang berbeda,

membuat hati mampu melakukan berbagai fungsi, termasuk dalam sistem *filtering*, *secretory* dan *excretory*. Populasi makrofag membantu dalam aktivitas pembersihan darah.



Gambar 2.4. Struktur Histologi Hati (Slomianka, 2009)

Hati terletak pada lokasi strategis yang penting. Produk pencernaan yang diserap, harus melalui kapiler-kapiler hati yang disebut sinusoid, setelah diantar melalui vena porta hepatica dan sebelum produk pencernaan dapat memasuki sirkulasi umum. Hati terdiri atas satuan heksagonal disebut lobulus hati. Terdapat sebuah vena sentral yang dikelilingi lempeng-lempeng sel hati, yaitu hepatosit dan sinusoid secara radial. Jaringan ikat tersebut membentuk triad porta atau daerah porta, tempat cabang arteri hepatica, cabang vena porta, dan cabang duktus biliaris. Sinusoid hati adalah saluran darah yang berliku-liku dan melebar, dengan diameter tidak teratur, dilapisi sel endothel bertingkap tidak utuh, yang dipisahkan dari hepatosit dibawahnya oleh ruang peisinusoidal, sehingga zat makanan dalam sinusoid kontak langsung dengan hepatosit. Proses ini memperlancar perpindahan zat antara darah dan hepatosit (Eroschenko, 2000).

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2010 hingga Maret 2011, bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Prosedur Kerja Penelitian

#### 3.2.1 Deskripsi Hewan Coba dan Estimasi Besar Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) dengan kriteria inklusi yaitu galur BALB/c, umur 8 minggu, dan keadaan sehat (bergerak aktif dan bulu tidak rontok). Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat Laik Etik no. 59, dari Komite Laik Etik Universitas Brawijaya. Penelitian ini menggunakan 6 perlakuan dan 3 ulangan, sehingga jumlah seluruh sampel mencit yang digunakan adalah 18 ekor.

#### 3.2.2 Deskripsi Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap yang terdiri dari 6 perlakuan dan 3 ulangan pada masing-masing perlakuan, seperti pada tabel berikut:

Tabel 3.1. Rancangan Kelompok perlakuan

<b>Non-Asma</b>	K-	Kontrol negatif
	P1NA	Non asma-kecubung dosis 0.56mg/kg BB
	P2NA	Non asma-kecubung dosis 1.12mg/kg BB
<b>Asma</b>	K+	Kontrol positif
	P1A	Asma-kecubung dosis 0.56mg/kg BB
	P2A	Asma-kecubung dosis 1.12mg/kg BB

#### 3.2.3 Sensitisasi Alergi

Sensitisasi alergi pada mencit dilakukan dengan injeksi ovalbumin (OVA) (Sigma-Aldrich) 10 $\mu$ g/ml secara intraperitoneal dalam AlOH<sub>3</sub> dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Amin. 2009). Larutan OVA dosis 10 $\mu$ g/ml sebanyak 200 $\mu$ l dimasukkan dalam *sprit* 1ml dan diinjeksikan secara intraperitoneal pada mencit perlakuan. Injeksi kedua (*booster*) dilakukan 7 hari setelah injeksi pertama dilakukan. Inhalasi OVA pada

mencit dilakukan pada hari ke-18, 21 dan 24, setelah *booster* OVA. Perlakuan pemicu asma dilakukan melalui inhalasi OVA dalam PBS steril dengan dosis 1mg/ml selama 20 menit. Inhalasi mencit dilakukan dengan memasukkan mencit ke dalam tabung transparan yang telah dihubungkan pada *Omron CompAir Compressor Nebulizer* yang berisi larutan OVA. Sedangkan mencit perlakuan non asma, diinjeksi PBS steril masing-masing 200 $\mu$ l pada hari yang sama dengan hari injeksi OVA.

### **3.2.4 Penentuan Dosis Fraksi Bunga Kecubung**

Dosis bunga kecubung dari hasil fraksi air ditentukan berdasarkan penelitian Abubakar, *et al.*, (2010), yang selanjutnya dikonversi ke mencit. Konversi dosis dilakukan dengan melihat tabel konversi dosis, yaitu ditentukan pada berat badan tikus 200 gram dan berat badan mencit 20gram (Hasibuan, 2009). Jika dosis pada tikus yaitu 4mg/kg berat badan tikus, maka berdasarkan hasil perhitungan konversi dosis diperoleh konversi dosis untuk tikus 200 gram kepada mencit 20 gram adalah 0,14, sehingga dosis untuk kelompok perlakuan asma 1 adalah  $0.14 \times 4$  atau sebesar 0,56 mg/Kg BB mencit, sedangkan untuk perlakuan asma 2 adalah 2 kali dosis mencit perlakuan asma 1 yaitu sebesar 1.12 mg/Kg berat badan mencit.

### **3.2.5 Ekstraksi dan Sonde Fraksi Air Bunga Kecubung pada Mencit Perlakuan**

Bunga kecubung (*Datura metel* Linn.) yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari Mergan, Kecamatan Sukun, Kota Malang. Bunga yang digunakan adalah tipe bunga kecubung berukuran kecil, yang terdiri dari dua lapis mahkota dan berwarna ungu. Identifikasi bunga kecubung (*Datura metel var.metel*) sebagai objek yang digunakan dalam penelitian ini telah mendapatkan surat identifikasi tanaman dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya. Bunga kecubung diambil dan dicuci menggunakan air untuk menghilangkan debu. Bunga kecubung selanjutnya dikering-anginkan selama 7 hari. Ekstraksi dilakukan menggunakan fraksi air. Bunga kecubung yang kering, dipotong kecil-kecil, kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan *pestle*. Fraksi air bunga kecubung diperoleh melalui perebusan dalam akuades steril dengan suhu 55 $^{\circ}$ C (Noumi, 2009). *Crude extract* bunga kecubung yang masuk ke dalam tubuh mencit berdasarkan pada berat badan mencit yang ditimbang, sebelum perlakuan

sonde fraksi air bunga kecubung. Perlakuan dilakukan setiap hari selama 5 hari.

### **3.2.6 Preparasi Sel Sebelum *Flowcytometry* Menggunakan Organ *Spleen***

Preparasi sel diawali dengan memisahkan *spleen* dari organ tubuh mencit yang telah di *sectio*. *Spleen* kemudian dicuci dalam PBS steril. *Spleen* diletakkan diatas cawan petri yang berisi 2ml PBS kemudian organ dihaluskan menggunakan pangkal spuit. Homogenat organ *spleen* disaring melalui *BD nylon cell stainer*<sup>TM</sup> 100µm dan dimasukkan ke dalam tabung propilen 15ml. Penyaringan suspensi *spleen* dilakukan berulang kali hingga volume suspensi *spleen*-PBS mencapai 15 ml. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit pada suhu 15<sup>0</sup>C. Supernatan dibuang, sedangkan pelet yang diperoleh disuspensikan kembali dengan 1ml PBS dan dihomogenkan. Jika suspensi tetap berwarna merah, dilakukan sentrifugasi kembali hingga diperoleh pelet berwarna putih.

### **3.2.7. Penghitungan Sel Menggunakan *Haemocytometer***

Suspensi pelet hasil isolasi *spleen* diambil sebanyak 5µl untuk penghitungan sel menggunakan *haemocytometer* yang dipasang pada mikroskop. Suspensi pelet ditambahkan 95µl *Tryphan Blue* dan dihomogenkan, sehingga sel mati terwarnai dan sel hidup dapat dihitung. Penghitungan sel hidup menggunakan kamar hitung dalam *haemocytometer* dan hasil penghitungan digunakan dalam analisa *flowcytometry*.

### **2.3.8 Analisis Perubahan Jumlah Subset Sel T menggunakan *Flowcytometry***

Suspensi pelet dari setiap sampel, masing-masing sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam 4 microtube steril yang telah berisi 1ml PBS. Suspensi selanjutnya disentrifugasi 3500 rpm pada suhu 15<sup>0</sup>C selama 2 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet diinkubasi dengan antibodi *BD Science*<sup>TM</sup> *antimouse CD4 FITC conjugated*, *antimouse CD25 FITC conjugated*, *PE-Cy*<sup>TM</sup> *7 Rat Antimouse,CD8* dan *PE-Cy*<sup>TM</sup> *7 Rat Antimouse CD62L* selama 15 menit. Pelet diambil dan dimasukkan dalam kuvet *flowcytometer* dan ditambah 500µl PBS steril. Kuvet dipasang pada *nozzle BD FACS Calibur*<sup>TM</sup> *flowcytometer*. Dilakukan *setting* pada komputer dengan *software BD Cell Quest Pro*<sup>TM</sup> dan dilakukan koneksi dengan *flowcytometer (Acquiring mode)*. Parameter yang diamati dalam

penelitian ini meliputi parameter kualitatif dan kuantitatif. Parameter kuantitatif meliputi perubahan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> mencit normal dan mencit model asma yang diukur melalui *flowcytometry*.

### **3.2.9 Pembuatan Preparat Bronkiolus dan Hati, serta Pengamatan Histopatologi dengan Pewarnaan Hematoksilen-Eosin**

Mencit yang telah dibedah, diisolasi bagian hati dan paru. Organ disterilisasi dan dimasukkan dalam larutan fiksatif PFA 4% dalam PBS. Dilakukan pembuatan preparat paru dan hepar dengan metode parafin. Preparat dideparafinasi dengan xilol sebanyak dua kali sebanyak empat menit untuk menghilangkan parafin. Dilakukan perendaman dengan alkohol bertingkat (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% dan 30%) masing-masing selama 3 menit. Preparat dicuci dengan aquades selama 5 menit dan diwarnai dengan Hematoksilen selama 1 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir 10 menit dan direndam dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan Eosin selama 4 menit, lalu direndam dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya, dilakukan *clearing* dengan xilol sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit dan *mounting* dengan entelan. Parameter kualitatif yang diamati yaitu pengaruh sonde fraksi air bunga kecubung terhadap perbaikan gambaran histopatologi hati dan bronkiolus dengan pewarnaan *Hematoxilen-Eosin*. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop Olympus BX51 yang terkoneksi dengan kamera digital Olympus DP20.

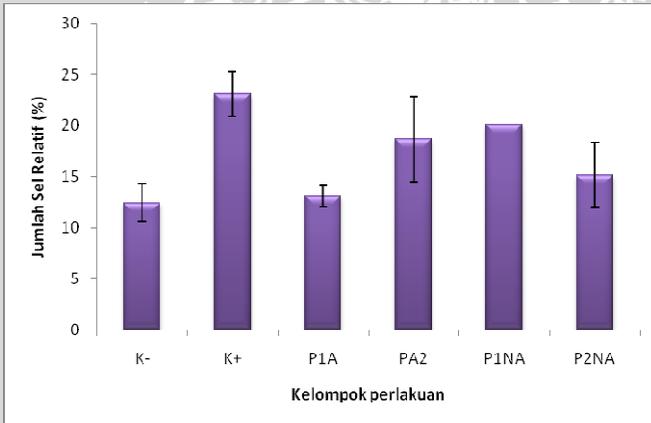
### **3.2.10 Analisa Data**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan menggunakan uji ANOVA selang kepercayaan 95%. Data yang digunakan berupa perubahan kuantitas jumlah absolut sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang diuji statistik dengan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Data yang telah terdistribusi normal dengan variansi homogen, diuji dengan *one-way* ANOVA dengan nilai  $\alpha = 0,05$ . Apabila diperoleh  $p > 0,05$  maka tidak terdapat beda nyata, sebaliknya bila  $p < 0,05$  menunjukkan ada perbedaan yang nyata antara perlakuan yang dibandingkan. Kemudian dilakukan *post-hoc test* dengan uji Tukey HSD (*High Significant Difference*). Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 13.0 for Windows.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Analisis Jumlah Total Sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> Menggunakan *Flowcytometry*

Hasil analisa *flowcytometry* pada *spleen* (Gambar 4.1) menunjukkan bahwa dari seluruh total sel, diketahui jumlah sel CD4<sup>+</sup> perlakuan asma meningkat signifikan sebesar 25.33% atau 20.18 juta sel (Lamp.13) dibandingkan dengan mencit sehat 10.60% atau 12.09 juta sel (Lamp. 13). Peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> disebabkan adanya paparan OVA sebagai alergen, sehingga memodulasi aktivitas proliferasi sel T CD4<sup>+</sup>. Data penelitian ini sesuai dengan pernyataan Akbari, *et al.*, (2006), yang menyatakan bahwa asma alergi dikarakteristikkan oleh inflamasi saluran pernafasan yang didominasi oleh kehadiran eosinofil dan sel T CD4<sup>+</sup> dalam jumlah besar. Respon imun seluler melawan antigen ekstraseluler termasuk alergen protein, didominasi oleh respon sel T CD4<sup>+</sup>. Sel T CD4<sup>+</sup> terinduksi setelah antigen berikatan dengan molekul MHC klas II (Pimentel, 2010).



Gambar 4.1. Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ) (K- = kontrol normal, K+ = kontrol asma, P1A = asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2A = asma kecubung 1.12mg/kg BB, P1NA = non-asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2NA = non-asma kecubung 1.12mg/kg BB).

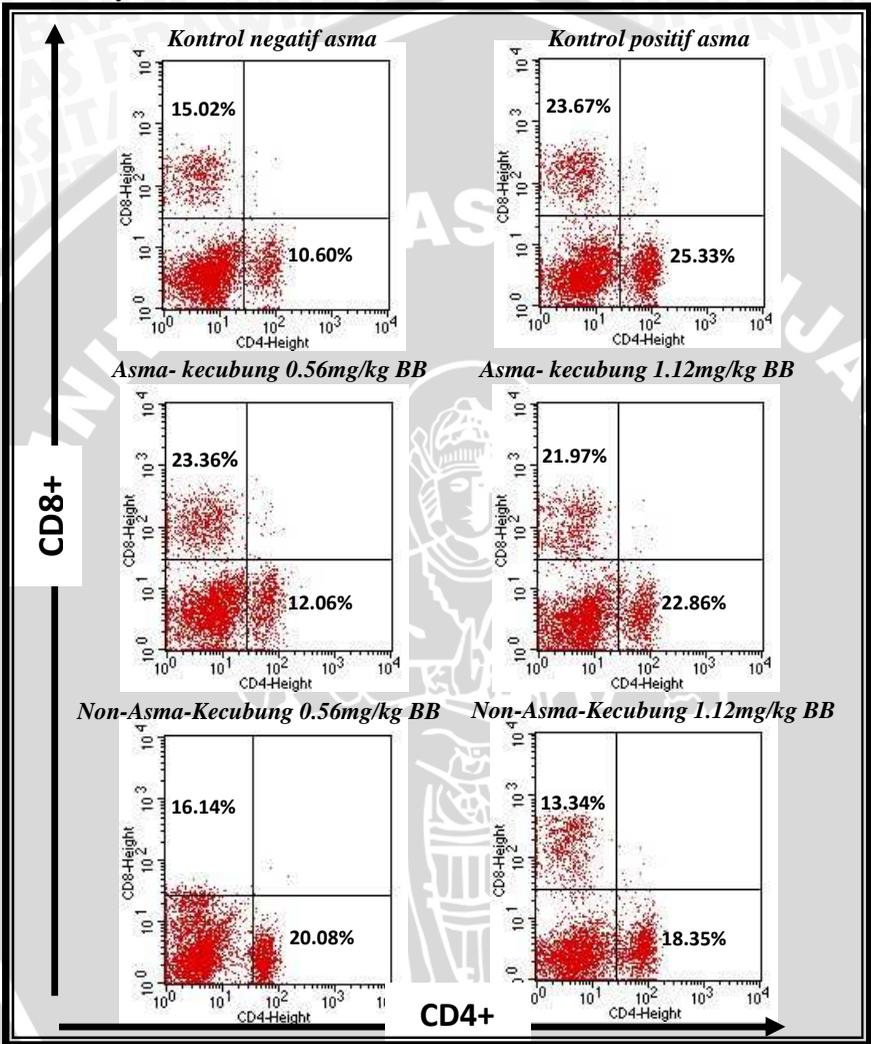
Frakasi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB menurunkan jumlah sel CD4<sup>+</sup> secara signifikan ( $p < 0.05$ ) dibandingkan dengan kontrol

asma. Fraksi air bunga kecubung 0.56mg/kg BB mampu menurunkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi secara signifikan, menjadi 12.06% atau 15.81 juta sel (Lamp. 13) mendekati jumlah normal (10.60%). Sedangkan pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 1.12mg/kg BB, menunjukkan bahwa jumlah sel CD4<sup>+</sup> pada perlakuan ini, tidak signifikan terhadap seluruh perlakuan. Hal ini mengindikasikan bahwa, senyawa aktif dalam fraksi air bunga kecubung mampu menekan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi akibat paparan OVA dan telah terjadi pengurangan inflamasi sehingga meredakan asma alergi. Variasi antar dosis fraksi air bunga kecubung tidak menunjukkan pengaruh berbeda nyata, sehingga fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB efektif meredakan serangan asma, dibandingkan dengan dosis 1.12mg/kg BB. Hal ini ditandai dengan berkurangnya jumlah sel CD4<sup>+</sup> secara signifikan.

Pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB pada mencit sehat menunjukkan peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> signifikan 20.08% atau 20.28 juta sel (Lamp. 13) dibandingkan perlakuan mencit normal. Sedangkan dosis 1.12mg/kg BB menunjukkan peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> yang tidak signifikan ( $p > 0.05$ ) 18.35% atau 15.52 juta sel (Lamp. 13) terhadap mencit normal. Kedua hasil tersebut mengindikasikan bahwa senyawa aktif dalam fraksi air bunga kecubung dapat memicu sel-sel imunokompeten melalui peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> walaupun mencit tidak terpapar alergen. Berdasarkan hasil tersebut, senyawa aktif dalam bunga kecubung diduga mampu memicu sel T CD4<sup>+</sup> pada mencit sehat, untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi subset sel T CD4<sup>+</sup> yang memiliki fungsi tertentu. Hasil ini mengindikasikan bahwa fraksi air bunga kecubung tidak dianjurkan diminum oleh orang sehat, karena pada dosis yang tinggi, kecubung berifat toksik (Alexander *et al.*, 2008)

Sel-sel T CD4<sup>+</sup> merupakan populasi limfosit utama yang menginfiltrasi saluran pernafasan dalam kasus asma dan teraktivasi pada saluran pernafasan. Sel T CD4<sup>+</sup> mengekspresikan molekul aktivasi permukaan kelas II antigen *histocompatibility* (HLA-DR), CD25 (IL-2R) dan VLA 1 (*Very Late Action Antigen 1*) (Yasef, 2007). Sensitisasi OVA pada saluran pernafasan memicu sel mast yang terletak pada bagian submukosa teraktivasi dan memicu proliferasi sel T CD4<sup>+</sup> untuk berdiferensiasi menjadi sel Th2. Paparan ulang alergen yang sama melalui inhalasi, memicu peningkatan proliferasi sel T CD4<sup>+</sup> secara

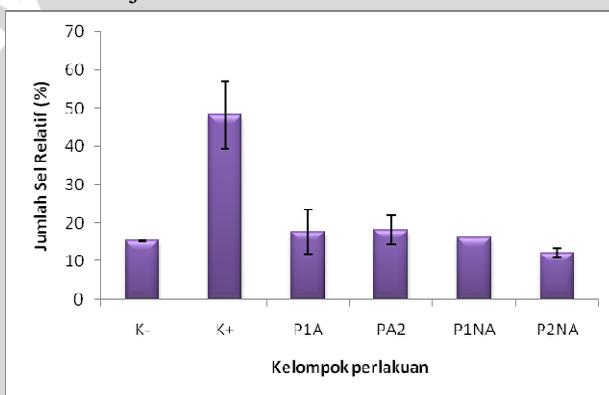
signifikan sebagai akibat adanya sel memori setelah sensitisasi OVA sebelumnya.



Gambar 4.2. Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Setiap Perlakuan Hasil Analisa *Flowcytometry* pada Organ *Spleen*.

Hasil analisa *flowcytometry* pada *spleen* (Gambar 4.2), menunjukkan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> perlakuan asma 23.67% atau 43.03 juta sel (Lamp. 14)

dibandingkan dengan mencit normal sebesar 15.02% atau 14.60 juta sel (Lamp. 14). Sel T CD8<sup>+</sup> berpartisipasi dalam inflamasi alergi saluran pernafasan. Sistem pertahanan dalam melawan parasit multiseluler umumnya ditemukan di bawah kulit atau pada jaringan limfoid yang berasosiasi dengan mukosa yang terdapat pada sepanjang usus halus dan saluran pernafasan (Rifa'i, 2011). OVA yang terpapar di saluran pernafasan, akan ditangkap oleh sel dendritik dan memodulasi proliferasi sel T menjadi CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>. Peningkatan sel T CD8<sup>+</sup> dapat disebabkan oleh adanya paparan OVA memicu sel-sel imunitas tubuh menuju ke tempat inflamasi terjadi dan sel ini membantu kerja sel T CD4<sup>+</sup> dalam menangani serangan alergen melalui regulasi pelepasan sitokin-sitokin pro-inflamatori menuju sasaran.



Gambar 4.3. Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup> (p<0.05) (K- = kontrol normal, K+ = kontrol asma, P1A = asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2A = asma kecubung 1.12mg/kg BB, P1NA = non-asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2NA = non-asma kecubung 1.12mg/kg BB).

Beberapa penelitian terdahulu menyatakan bahwa sel T CD8<sup>+</sup> berperan dalam kejadian asma. Mencit model asma menunjukkan bahwa sel T CD8<sup>+</sup> dikerahkan menuju saluran pernafasan dan memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10 berdasarkan stimuli antigen (Stock, *et al.*, 2004). Miyahara, *et al.*, (2004), menyatakan bahwa pada mencit *deficient* CD8, transfer adoptif antigen sel T CD8 dibutuhkan untuk perkembangan alergen menginduksi AHR (*Airway Hiperreactivity*) dan inflamasi. Penelitian lainnya menyatakan bahwa mengembalikan sel T CD8 melalui

transfer adoptif mengembalikan kembali kemampuan perkembangan AHR pada mencit model asma (Hamelmann, *et al.*, 1996).

Terapi asma menggunakan fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB, menunjukkan penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> yang signifikan (23.3% atau 21.05 juta sel;  $p < 0.05$ ) terhadap kontrol positif asma. Sedangkan pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 1.12mg/kg BB juga menunjukkan penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> yang signifikan (21.97% atau 16.77 juta sel) terhadap kontrol positif asma, namun tidak signifikan terhadap dosis 0.56mg/kg BB. Hasil ini mengindikasikan bahwa dosis 0.56mg/kg BB lebih efektif menyembuhkan serangan asma dibandingkan dengan dosis 1.12mg/kg BB, karena pada dosis tersebut jumlah sel T CD8<sup>+</sup> menurun hingga mendekati jumlah sel T CD8<sup>+</sup> pada mencit normal. Berdasarkan hasil tersebut, mengindikasikan bahwa pemberian fraksi air bunga kecubung mampu menurunkan tingkat inflamasi yang terjadi pada mencit asma, ditandai dengan berkurangnya populasi sel T CD8<sup>+</sup>. Penurunan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> pasca pemberian fraksi air bunga kecubung, diduga akibat aktivitas senyawa aktif *scopolamine*, salah satu jenis alkaloid pada bunga kecubung, yang memiliki peran pada sistem saraf pusat. Senyawa aktif ini dapat memicu kerja saraf parasimpatik untuk melakukan pengaturan kontraksi pada otot polos saluran pernafasan. Adanya pengaturan kontraksi ini, diduga dapat mengembalikan kondisi otot polos saluran pernafasan yang mengalami bronkokonstriksi, sehingga kembali mengalami relaksasi.

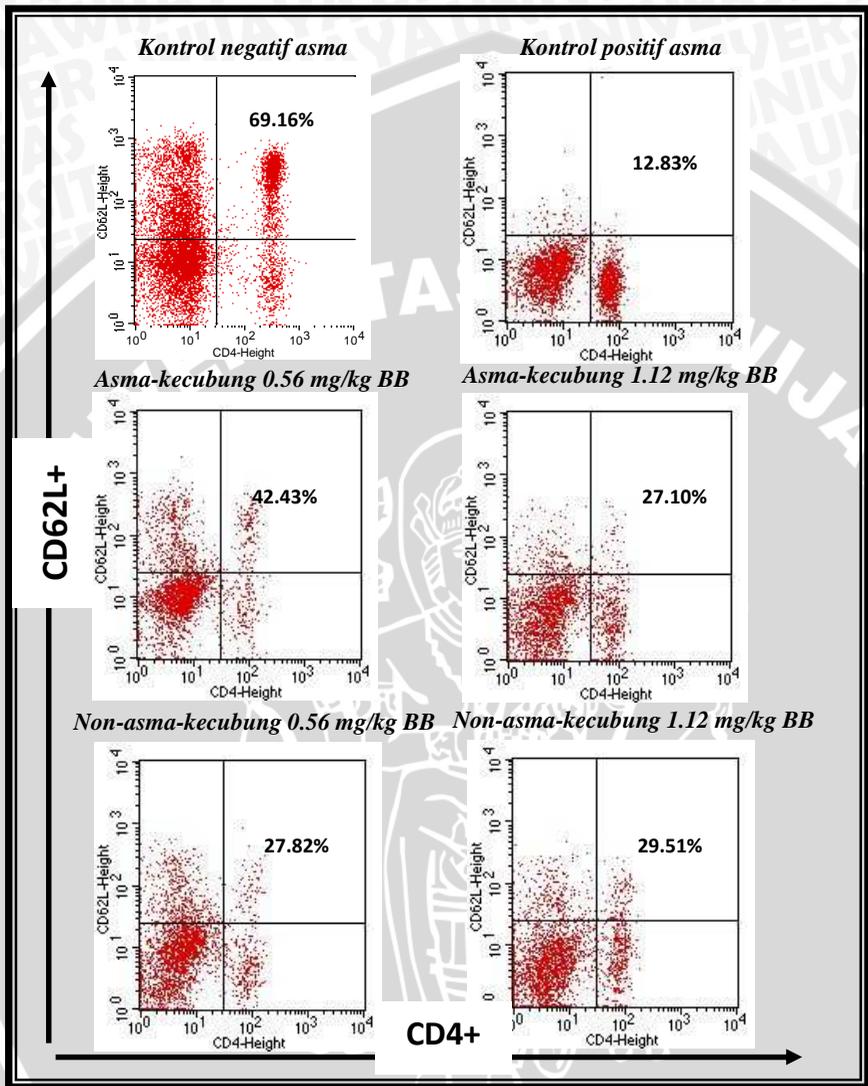
Pemberian fraksi air bunga kecubung pada mencit sehat menimbulkan respon sel-sel imunokompeten dalam tubuh. Berdasarkan hasil analisa *flowcytometry* (Gambar 4.1), jumlah sel T CD8<sup>+</sup> pasca pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB tidak berbeda nyata ( $p < 0.05$ ) dibandingkan dengan mencit normal. Fraksi air bunga kecubung dosis 1.12m/kg BB menunjukkan penurunan jumlah relatif sel T CD8<sup>+</sup> yang tidak signifikan dibandingkan mencit normal. Hasil ini mengindikasikan bahwa senyawa aktif yang terlarut dalam fraksi air bunga kecubung pada kedua dosis dapat menimbulkan reaksi pada sel-sel imunokompeten, namun tidak menyebabkan inflamasi. Inflamasi dipicu oleh sekresi sitokin pro-inflamasi dan sel T CD8<sup>+</sup> bertugas untuk mengontrol produksi sitokin pro-inflamasi.

Peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> disebabkan oleh sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi mengekspresikan berbagai molekul permukaan, seperti CD8 atau CD25 yang bertujuan untuk melawan dan meregulasi aksi sel-sel

efektor yang teraktivasi akibat paparan alergen. Respon imun yang timbul akibat adanya paparan antigen, menyebabkan interaksi antara CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>. Sel T CD4<sup>+</sup> akan mengenal antigen yang berasal dari mikroba vesikuler dan mengaktifkan makrofag untuk membunuh mikroba dalam vesikel. Sedangkan sel CD8<sup>+</sup> mengenal antigen yang berasal dari sitoplasma dan menyingkirkan mikroba dengan membunuh sel terinfeksi (Baratawidjaja, 2006). Sel T CD8<sup>+</sup> dibutuhkan untuk mengontrol sitokin-sitokin pro-inflamasi dan membantu kerja CD4<sup>+</sup> ketika respon sel CD4<sup>+</sup> tidak mampu mengatasi antigen yang masuk dalam tubuh, sehingga proliferasi dan diferensiasi sel T untuk menjadi sel T sitotoksik tidak meningkat (Wahyuni, 2009).

#### **4.2. Analisis Jumlah Total Sel CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Menggunakan Flowcytometry**

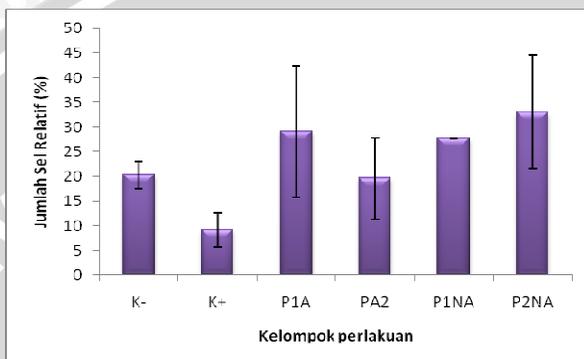
Berdasarkan hasil analisa flowcytometry sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> menunjukkan penurunan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> mencit normal, signifikan dibandingkan dengan perlakuan asma (Gambar 4.4). Jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> perlakuan kontrol menurun signifikan, dari 69.16% atau 19.25 juta sel (Gambar 4.4) menjadi 12.83% (8.35 juta sel), setelah mencit dipapar OVA. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Lin, *et al.*, (2003), yang menyatakan bahwa ekspresi L-selektin atau CD62L menurun signifikan pada penderita asma akut. Namun demikian, hasil penelitian ini berlawanan dengan penelitian Matsuzaki, *et al.*, (2004), yang menyatakan bahwa jumlah sel T yang mengekspresikan molekul adhesi CD62L (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) tidak signifikan antara pasien normal dengan penderita asma. Paparan OVA sebagai alergen memicu aktivitas sel T naïve untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel imun dengan fungsi tertentu. Sel naïve memiliki berbagai molekul permukaan sel, salah satunya adalah molekul adhesi CD62L, sebagai penanda keberadaan sel T naïve. Penurunan sel T yang mengekspresikan CD62L, disebabkan oleh adanya paparan OVA yang memicu diferensiasi sel T naïve menjadi sel-sel efektor, misalnya sel T CD4<sup>+</sup> yang mengekspresikan CD8<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> dan CD44<sup>+</sup>. CD62L merupakan marker aktivasi sel, sehingga penurunan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> mengindikasikan aktivitas sel naïve yang berubah menjadi subset sel T CD4<sup>+</sup>, misalnya sel T regulator akibat paparan alergen ke dalam tubuh.



Gambar 4.4. Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Setiap Perlakuan Hasil Analisa *Flowcytometry*

Paparan OVA memicu penggerakan eosinofil menuju saluran pernafasan yang mengakibatkan inflamasi saluran pernafasan. Molekul adhesi CD62L memediasi interaksi limfosit dengan vaskuler endotelium, yang berperan dalam migrasi selektif limfosit menuju saluran pernafasan

yang mengalami inflamasi selama respon inflamasi alergi (Lin, *et al.*, 2003). L selektin (CD62L) merupakan pengikat awal dari leukosit menuju endotelium dan tidak tereksprese kembali setelah aktivasi neutrofil oleh pembelahan proteolitik (Mann, 2006), sehingga pada mencit model asma, jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> berkurang signifikan.



Gambar 4.5. Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ) (K- = kontrol normal, K+ = kontrol asma, P1A = asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2A = asma kecubung 1.12mg/kg BB, P1NA = non-asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2NA = non-asma kecubung 1.12mg/kg BB).

Pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB meningkatkan ekspresi jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> signifikan terhadap perlakuan asma (Gambar 4.5). Fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB meningkatkan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> sebesar 42.43% atau 35.53 juta sel (Lamp. 17) dibandingkan dengan perlakuan asma. Sedangkan pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 1.12mg/kg BB menunjukkan peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> dibandingkan dengan perlakuan asma, namun tidak signifikan terhadap dosis 0.56mg/kg BB. Hasil ini mengindikasikan bahwa variasi dosis fraksi air bunga kecubung yang digunakan dalam penelitian ini tidak memiliki dampak yang berbeda nyata, sehingga dapat dikatakan dosis yang lebih aman dan efektif digunakan sebagai terapi asma adalah 0.56mg/kg BB.

Berdasarkan data penelitian ini, senyawa aktif dalam fraksi air bunga kecubung kedua dosis memperlihatkan perbaikan kondisi mencit model asma yang ditandai meningkatnya ekspresi CD62L pasca pemberian fraksi air bunga kecubung. Adanya paparan alergen menyebabkan sel T yang mengekspresikan CD62L, tidak

mengekspresikan CD62L kembali, namun mengekspresikan molekul permukaan aktivasi sel, misalnya CD69, CD25 atau CD44. Senyawa aktif bunga kecubung diduga mampu menyembuhkan asma melalui berbagai mekanisme, sehingga paparan alergen berkurang dan sel T naïve tidak teraktivasi secara berkelanjutan.

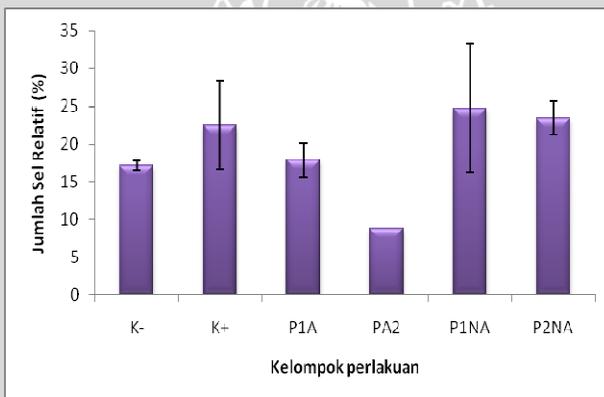
Pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB pada mencit normal menunjukkan peningkatan tidak signifikan dibandingkan mencit sehat. Sedangkan fraksi air bunga kecubung dosis 1.12mg/kg BB menunjukkan peningkatan jumlah sel T  $CD4^+CD62L^+$  yang signifikan terhadap perlakuan mencit sehat dan mencit asma perlakuan fraksi air bunga kecubung 0.56mg/kg BB. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa aktif dalam fraksi air bunga kecubung dalam mencit normal menyebabkan aktivasi sel T naïve, sehingga pemberian fraksi air bunga kecubung pada individu sehat tidak dianjurkan.

#### **4.3. Analisis Jumlah Total Sel $CD4^+CD25^+$ Menggunakan Flowcytometry**

Jumlah sel T yang mengekspresikan CD25 ( $CD4^+CD25^+$ ) meningkat pada mencit asma sebesar 28.28% atau 2.76 juta sel (Lamp. 19), tidak signifikan dibandingkan dengan mencit normal sebesar 17.81% atau 1.81 juta sel (Lamp. 19). Peningkatan jumlah sel T ( $CD4^+CD25^+$ ) pada mencit asma disebabkan adanya respon imun akibat adanya paparan OVA sebagai alergen yang menyebabkan aktivasi berbagai jenis sel. Sel T  $CD4^+$  memiliki subset yang mengekspresikan beberapa molekul permukaan tertentu, dimana setiap molekul permukaan merupakan penanda fungsi setiap sel. CD25 merupakan salah satu molekul permukaan sel T  $CD4^+$ , yang jika terekspresi menjadikan sel T tersebut berfungsi, salah satunya sebagai sel T regulator. Sel T regulator merupakan *smart cell* berfungsi sebagai regulator dan *suppressor*, menekan aktivasi sel-sel imun lainnya, akibat sekresi sitokin-sitokin proinflamasi, tetapi akan berhenti berproliferasi jika sistem imun telah mampu mengatasi serangan alergen yang masuk ke dalam tubuh. Selain sebagai sel regulator, sel T  $CD4^+CD25^+$  dapat pula bertindak sebaliknya, yaitu sebagai sel efektor, karena sel ini tidak mengekspresikan Foxp3 ( $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ ) sebagai penentu fungsi sel ini sebagai regulator.

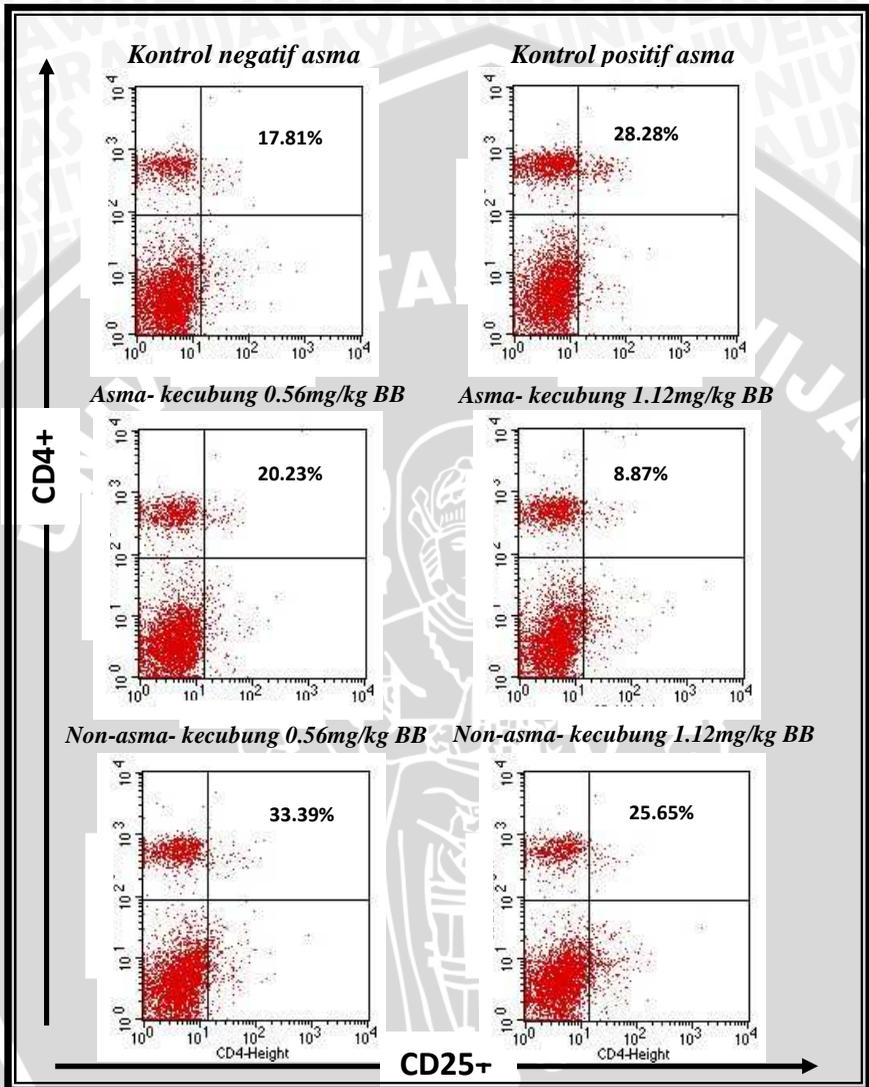
Pemberian fraksi air bunga kecubung pada mencit asma dosis 0.56mg/kg BB menurunkan jumlah sel T  $CD4^+CD25^+$  20.23% atau 2.81 juta sel (Lamp. 19), tidak signifikan terhadap jumlah sel T  $CD4^+CD25^+$  pada mencit asma. Sedangkan pemberian fraksi air bunga kecubung dosis

1.12 mg/kg BB memicu penurunan ekspresi sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hingga 8.87% (1.34 juta sel). Penurunan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pada mencit perlakuan kecubung, diduga akibat peran sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sebagai sel efektor yang menurun akibat pemberian fraksi air bunga kecubung. Jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pada mencit perlakuan kecubung dosis 1.12mg/kg BB, mengalami penurunan hingga 8.87% diduga akibat jumlah sel yang teraktivasi ditekandengan adanya bahan aktif dalam bunga kecubung yang mampu mensupresi jumlah sel efektor pada konsentrasi yang lebih tinggi. Fungsi sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dalam penelitian ini, penting dikonfirmasi pada penelitian selanjutnya. Hal ini disebabkan karena sel T CD4<sup>+</sup> yang mengekspresikan CD25, dapat berperan sebagai sel konvensional yang mengalami aktivasi akibat paparan alergen, atau berfungsi sebagai sel T regulator. Oleh karena itu, peran sel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> penting untuk diuji pada penelitian selanjutnya menggunakan Foxp3.



Gambar 4.6. Perubahan Jumlah Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) ( $p < 0.05$ ) (K- = kontrol normal, K+ = kontrol asma, P1A = asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2A = asma kecubung 1.12mg/kg BB, P1NA = non-asma kecubung 0.56mg/kg BB, P2NA = non-asma kecubung 1.12mg/kg BB).

Mencit sehat yang diberikan fraksi air bunga kecubung baik pada dosis 0.56 dan 1.12mg/kg BB, memicu peningkatan jumlah sel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, yaitu sebanyak 33.39% atau 3.05 juta sel (Lamp. 19) pada dosis 0.56mg/kg BB dan 25.65% atau 3.25 juta sel (Lamp. 19) pada dosis 1.12mg/kg BB. Hal ini diduga adanya kandungan alkaloid *scopolamine* dalam bunga kecubung yang menstimulasi aktivasi sel naïve menjadi subset sel T yang dapat bertindak sebagai efektor maupun regulator.



Gambar 4.7. Persentase Jumlah Relatif sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pada Setiap Mencit Perlakuan Hasil Analisa *Flowcytometry*

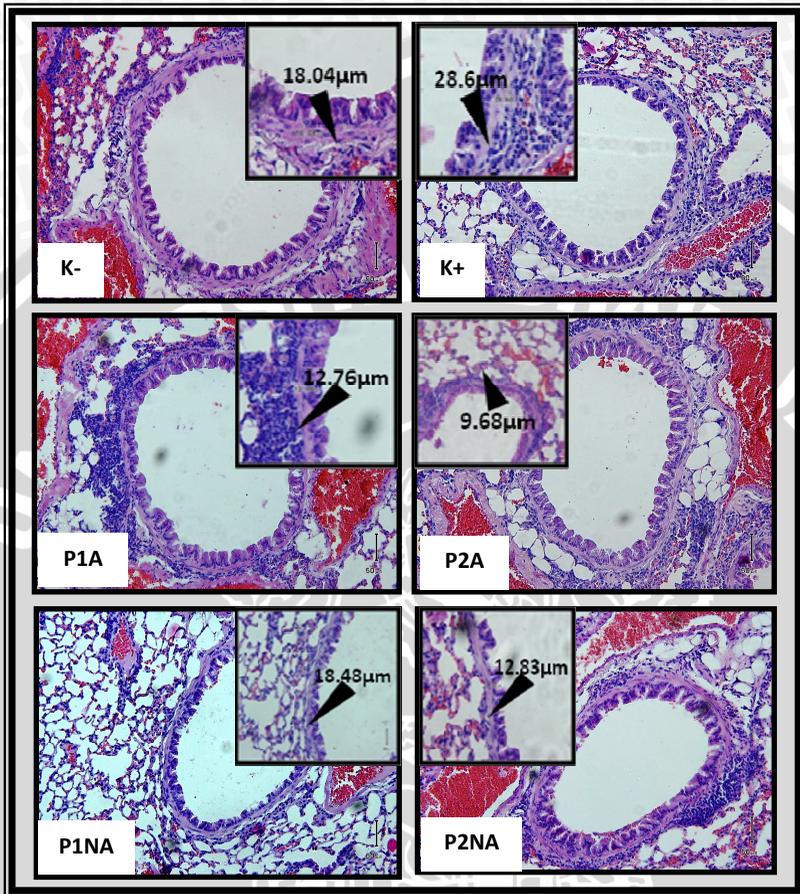
Sel T CD4<sup>+</sup> yang mengekspresikan molekul permukaan CD25, dapat berperan sebagai sel T regulator atau berperan sebagai sel T efektor. Peran sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sebagai sel T regulator diketahui berdasarkan adanya ekspresi Foxp3. Sedangkan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tanpa

ekspresi Foxp3 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>), menunjukkan sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tersebut adalah sel konvensional yang terpapar oleh alergen sehingga teraktivasi menjadi sel efektor. Penelitian ini tidak menggunakan anti Foxp3, sehingga tidak dapat menjustifikasi peran sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pada hasil penelitian ini. Namun, jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> yang tinggi pada mencit normal yang diberi fraksi air bunga kecubung, diduga adalah sel konvensional yang mengekspresikan molekul permukaan CD25 dan sel T regulator yang pasti akan meningkat seiring dengan masuknya substansi asing ke dalam tubuh. Molekul permukaan CD25 dikenal pula sebagai reseptor IL2- $\alpha$ , yang dapat diekspresikan oleh sel-sel konvensional selain sel T CD4<sup>+</sup> (Lee, *et al.*, 2006).

Mekanisme regulasi imunitas sel T regulator dan dampaknya terhadap sel T teraktivasi lainnya hingga kini masih kontroversi, namun mekanisme sel T regulator melibatkan peran penting sitokin, interaksi antar sel, modifikasi APC oleh sel T regulator serta kompetisi dengan sel T naïve untuk menanggapi antigen yang sama dalam adhesi terhadap sel APC. Sel T regulator diduga memblokir transisi dari tahap awal proliferasi sel T naïve menjadi sel Th2, membatasi peningkatan inflamasi saluran pernafasan, dan berperan untuk mencegah respon Th2 yang menyimpang terhadap alergen. Respon supresi tergantung pada dosis, misalnya kadar supresi akan meningkat, jika jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> meningkat pula. Prosentase supresi CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> meningkat signifikan pada pasien asma bronkial dibanding kontrol (Lee, *et al.*, 2006).

#### **4.4. Analisis Histopatologi Jaringan Bronkiolus Pasca Pemberian Fraksi Bunga Kecubung (*Datura metel* L.)**

Beberapa parameter menentukan respon asma dalam mencit model asma, salah satunya melalui preparat histologi saluran pernafasan yang ditunjukkan pada Gambar 4.11. Berdasarkan penampang preparat bronkiolus dengan pewarnaan Hematoksilen-Eosin (Gambar 4.8), diketahui bronkiolus mencit sehat (Gambar 4.8. K-) terdiri atas gambaran normal lapisan epitel semu silindris bersilia, lamina propria tipis, selaput otot polos, dan sedikit sel mononuklear yang berada pada struktur parenkima peribronkial. *Airway remodeling* tampak pada tekstur histologi bronkiolus pada mencit asma (Gambar 4.8.B). Perubahan tersebut tampak pada lapisan otot polos mengalami penebalan dari 18.04 $\mu$ m menjadi 28.6 $\mu$ m. Asma merupakan penyakit inflamasi kronis yang dikarakteristikan oleh terbatasnya aliran udara dan hiperreaktivitas saluran pernafasan.



Gambar 4.8. Struktur Histologi Bronkiolus; kontrol negatif asma (K-); kontrol positif asma (K+); Asma-kecubung dosis 0.56mg/kg BB (P1A); Asma-kecubung dosis 1.12mg/kg BB (P2A); Non-asma kecubung dosis 0.56mg/kg BB (P1NA); Non-asma kecubung dosis 1.12mg/kg BB (P2NA); penebalan lapisan otot polos (anak panah) (200x); bar 50µm.

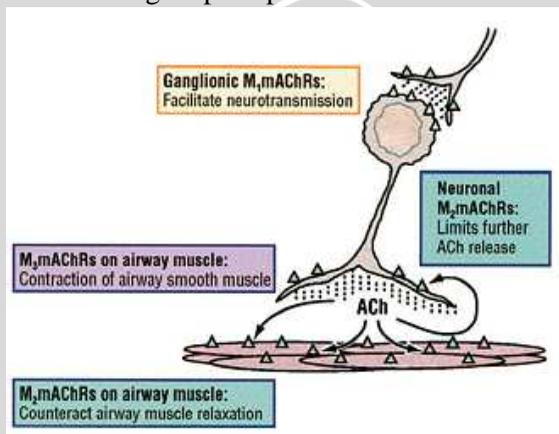
Sensitisasi alergen merupakan prasyarat yang mengawali jalur inflamasi asma bronkial, sedangkan *booster* atau paparan antigen ulang menyebabkan inflamasi lapisan mukosa dan submukosa saluran pernafasan. Sel T *helper* 2 (Th2) merupakan sel yang bertanggung jawab

terhadap inflamasi saluran pernafasan. Inflamasi persisten pada penderita asma menyebabkan perubahan struktur histologi atau *airway remodeling*.

Terapi asma melalui pemberian fraksi air bunga kecubung dengan dosis 0.56mg/kg BB selama 5 hari (Gambar 4.8. C), memberi pengaruh terhadap penyembuhan inflamasi yang terjadi dalam bronkiolus, yang ditampakkan oleh berkurangnya penebalan lapisan otot polos mendekati normal, yaitu setebal 12.76 $\mu$ m. Pada mencit asma yang diberikan fraksi air bunga kecubung, menunjukkan adanya perbaikan struktur bronkiolus, ditandai oleh adanya penurunan ketebalan otot polos dibandingkan dengan mencit asma. Hal ini diduga akibat senyawa aktif dalam bunga kecubung, misalnya alkaloid jenis *scopolamine*, yang memiliki pengaruh terhadap relaksasi otot polos. Variasi dosis menunjukkan perbaikan gambaran histologi bronkiolus sebagai saluran pernafasan, berdasarkan pengukuran ketebalan otot polos. Tetapi, berdasarkan preparat histologi dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB lebih efektif, karena dosis tersebut menunjukkan hasil yang hampir sama dengan dosis 1.12mg/kg BB yang lebih besar.

Mencit sehat yang diberikan sonde fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB memperlihatkan tekstur histologi yang mendekati mencit normal tanpa perlakuan. Sedangkan mencit sehat yang disonde fraksi air bunga kecubung dosis 1.12 mg/kg BB menunjukkan bahwa dibandingkan dosis 0.56mg/kg BB, ketebalan otot polosnya semakin tipis. Hal ini diduga akibat aktivitas alkaloid *scopolamine* dan bahan aktif dalam bunga kecubung pada dosis yang tinggi bersifat toksik terhadap tubuh, menyebabkan relaksasi otot polos yang berlebihan sehingga menyebabkan gangguan terhadap kinerja otot polos pada berbagai organ. Senyawa aktif dalam fraksi air bunga kecubung yang diduga memiliki peran penting dalam penyembuhan penyakit asma adalah *scopolamine*. *Scopolamine* merupakan salah satu jenis alkaloid tropan yang bersifat *anticholinergics*, sehingga diduga dapat merelaksasi otot polos pernafasan yang mengalami bronkokonstriksi. Meskipun sebagian besar alkaloid hanya mampu terlarut dalam pelarut organik, *scopolamine* dapat larut dalam air (Kutama, *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian Alexander, *et al.*, (2008), *scopolamine* berperan secara kompetitif dan reversibel menghambat asetilkolin neurotransmitter bebas melalui ikatan dengan reseptor muscarinic dan sifat antagonis ini menyebabkan menginduksi relaksasi otot polos pernafasan.

Beberapa mekanisme penyembuhan asma melalui agen *anticholinergics* (termasuk *scopolamine*) telah diteliti sebelumnya. Namun, sebagian besar menitikberatkan pada penghambatan sekresi asetilkolin neurotransmitter. Sekresi asetilkolin dari saraf parasimpatis meregulasi nada saluran pernafasan, kontraksi otot polos saluran pernafasan, dan vasodilatasi, melalui interaksi dengan reseptor muscarinic asetilkolin (mAChRs) yang terdapat di otot polos saluran pernafasan (Belmonte, 2005). Asetilkolin juga dapat diproduksi oleh epithelium bronkial dan sel-sel inflamasi dan terlibat dalam mekanisme terjadinya *airway remodeling*. Asetilkolin dan enzim yang disintesis yaitu choline acetyltransferase (ChAT) terdapat pada limfosit, makrofag, sel-sel mast, eosinofil, dan neutrofil (Gosen, *et al.*, 2006). Sehingga diduga sekresi asetilkolin meningkat pada penderita asma.

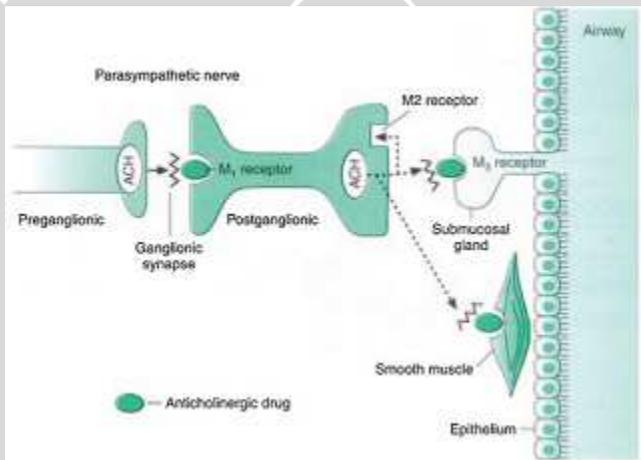


Gambar 4.9. Peran Reseptor Muscarinic Dalam Saluran Pernafasan (Belmonte, 2005).

Reseptor muscarinic asetilkolin (mAChRs) merupakan reseptor yang berfungsi meregulasi sekresi asetilkolin. Reseptor muscarinic yang terlibat dalam saluran pernafasan adalah M<sub>2</sub> dan M<sub>3</sub>. Reseptor muscarinic menginduksi kontraksi otot polos saluran pernafasan melalui sejumlah mekanisme signal intraseluler. Asetilkolin (ACh) disekresikan oleh saraf parasimpatis, berikatan dengan M<sub>3</sub> mAChRs pada otot polos saluran pernafasan, sehingga menyebabkan kontraksi (Gambar 4.9). M<sub>2</sub> mAChRs yang berada pada otot polos saluran pernafasan memfasilitasi M<sub>3</sub> mAChRs melalui penghambatan akumulasi CAMP, menghambat

aktivitas cholinergic sehingga merelaksasi otot polos. Reseptor ini juga berfungsi dalam meregulasi sekresi asetilkolin (Belmonte, 2005).

Bronkokonstriksi dan sekresi mukus sebagian besar disebabkan oleh peningkatan aktivitas saraf parasimpatis yang dimediasi oleh reseptor muscarinic. mAChRs merupakan reseptor protein berpasangan, dengan asetilkolin sebagai ligan. Asetilkolin mengikat reseptor muscarinic dan menginisiasi jalur informasi dalam sel. Ikatan antara reseptor muscarinic  $M_2$  dengan asetilkolin mereduksi pengeluaran asetilkolin. Peningkatan sekresi asetilkolin dari saraf terminal cholinergics dan ekspresi reseptor muscarinic abnormal serta gangguan pada reseptor muscarinic  $M_2$  merupakan salah satu penyebab meningkatnya sekresi asetilkolin dan penyebab bronkokonstriksi pada pasien asma.



Gambar 4.10. Mekanisme Penyembuhan Asma Melalui Blokade Reseptor Muscarinic Oleh *Scopolamine* (Anticholinergics) (Belmonte, 2005).

Pengaruh sejumlah alkaloid yang terkandung dalam beberapa jenis herbal menunjukkan adanya peran alkaloid dalam menghambat reaktivitas sel-sel naïve menjadi sel efektor. Hal ini sesuai dengan penelitian Rosen (2007), yang menyatakan bahwa alkaloid berdampak pada aktivasi sel mast yang terpapar alergen, sehingga mencegah sel mast terdegranulasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah sel T  $CD4^+CD62L^+$  pada mencit asma yang diberikan fraksi air bunga kecubung menunjukkan peningkatan yang signifikan. Hal ini diduga

adanya mekanisme senyawa aktif dalam bunga kecubung yang menghambat aktivasi dan degranulasi sel mast ketika berikatan dengan alergen pada kompleks reseptor Fc $\epsilon$ RI, sehingga kemampuan sel mast untuk berdegranulasi dan menghasilkan histamin serta memicu sitokin pro-inflamasi menjadi berkurang. Hasil pengukuran jumlah sel T CD8<sup>+</sup> juga menunjukkan penurunan yang signifikan pasca pemberian fraksi air bunga kecubung, yang mengindikasikan bahwa inflamasi telah berkurang.

Penurunan reaktivitas sel mast akibat paparan alergen, mengakibatkan produksi histamin dan mediator pro-inflamasi menjadi berkurang. Hal ini berhubungan pula dengan pengerahan sel-sel inflamasi, seperti makrofag, eosinofil dan neutrofil. Berkurangnya jumlah pengerahan sel-sel tersebut pada *inflammation site*, diduga menjadi salah satu faktor penurunan produksi asetilkolin. Penurunan kadar asetilkolin ini, berdampak pada jumlah pengikatan asetilkolin dengan reseptor muscarinic. *Scopolamine* merupakan salah satu jenis *anticholinergic* alami. Salah satu sifat *anticholinergic* adalah memblokir secara spesifik terhadap muscarinic reseptor M<sub>3</sub> namun tidak spesifik terhadap M<sub>2</sub>, sehingga mengakibatkan kontraksi berkurang dan terjadi relaksasi akibat adanya kecenderungan pengikatan asetilkolin dengan reseptor muscarinic M<sub>2</sub>.

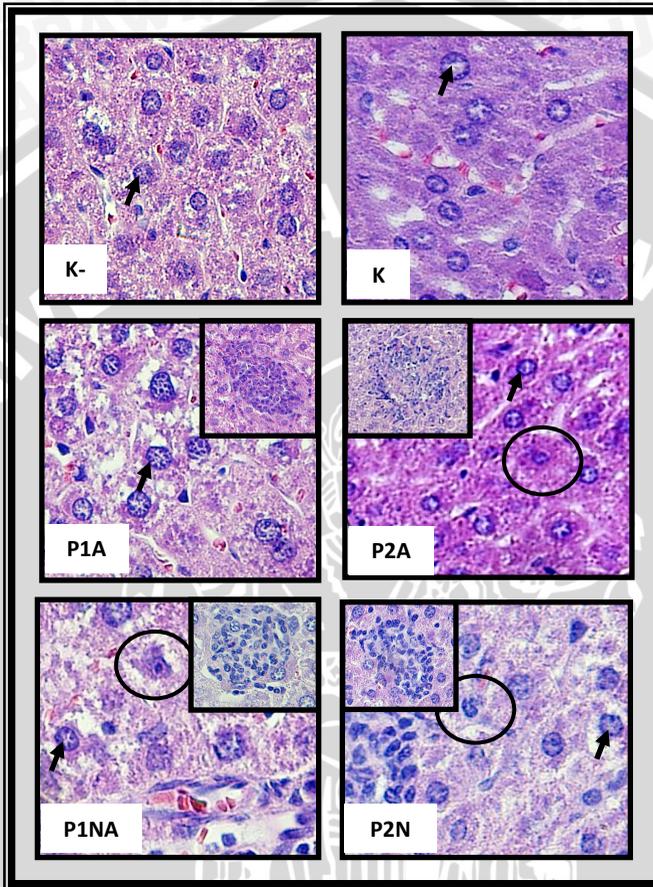
Fraksi air bunga kecubung yang diduga mengandung *scopolamine* sebagai salah satu kelompok *anticholinergics* diduga dapat menyembuhkan asma melalui pengurangan sekresi asetilkolin yang bebas untuk berikatan dengan reseptor muscarinic M<sub>3</sub> secara berlebihan, berikatan dengan reseptor muscarinic M<sub>2</sub> pada otot polos pernafasan dan ikatan antara asetilkolin dengan reseptor muscarinic M<sub>1</sub> pada ganglion sinaps (Gambar 4.10), sehingga asetilkolin yang disekresi baik oleh saraf parasimpatis maupun oleh limfosit, akan berikatan dengan reseptor muscarinic M<sub>2</sub> pada neuronal, dan menginduksi terjadinya relaksasi otot polos saluran pernafasan. Selain itu, mekanisme lain *scopolamine* dalam merelaksasi otot polos saluran pernafasan diduga melalui penghambatan spesifik sel mast oleh *scopolamine*, sehingga mencegah sekresi sitokin pro-inflamasi dan mediator inflamasi yang berkontribusi terhadap bronkokonstriksi otot polos saluran pernafasan.

#### 4.4. Analisis Toksisitas Hati Pasca Pemberian Fraksi Bunga Kecubung (*Datura metel* L.)

Hasil analisa efek toksisitas fraksi air bunga kecubung pada histopatologi hati mencit tanpa perlakuan (Gambar 4.11. K-), menunjukkan struktur hepatosit dalam kondisi normal, yaitu sel hepatosit berbentuk heksagonal, dengan nukleus berada di tengah dan di dalam nuklei, tampak ada nukleoli yang berwarna gelap (tanda panah). Paparan OVA pada saluran pernafasan, tidak menyebabkan adanya kerusakan tekstur hepatosit (Gambar 4.11. K+). Pemberian fraksi air bunga kecubung pada mencit model asma dosis 0.56mg/kg BB tidak menunjukkan kerusakan pada struktur sel hepatosit, sedangkan dosis 1.12mg/kg BB, menunjukkan tanda-tanda kerusakan jaringan hati. Kerusakan tersebut ditunjukkan dengan struktur sel hepatosit yang mengalami tanda-tanda nekrosis. Nekrosis yaitu kejadian kematian sel yang disebabkan oleh proses patologi. Beberapa penyebab sel mengalami nekrosis antara lain akibat virus, mikroorganisme, bahan kimia, atau agen berbahaya lainnya (Junqueira, 2005). Ciri-ciri sel yang akan mati akibat nekrosis yaitu terjadi kondensasi kromatin, penyusutan nukleus, nukleus mengalami pyknotic dan destruksi integritas membran (Szabo, 2000). Gambar 4.11 (P1A dan P2A) menunjukkan adanya sel yang menunjukkan tanda-tanda nekrosis, yaitu inti sel atau nukleus mengalami penyusutan dibandingkan sel hepatosit lainnya dan nukleus mengalami pyknotic (lingkaran hitam). Nukleus pyknotic adalah nukleus yang mengalami penyusutan ukuran dan nukleoli memadat dan terjadi kondensasi kromatin, sehingga nukleus tampak berwarna ungu padat dengan ukurannya mengecil dan tidak tampak kembali nukleoli.

Fraksi air bunga kecubung yang disonde pada mencit, baik mencit model asma ataupun mencit non-asma, menimbulkan perubahan struktur histologi jaringan hati. Selain adanya sel hepatosit yang inti selnya mengalami pyknotic, fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB dan 1.12mg/kg BB mengakibatkan adanya kumpulan sel-sel mononuklear di beberapa area jaringan hati. Adanya kumpulan sel mononuklear tersebut (insert Gambar 4.11 P1A, P2A, P1NA, dan P2NA) diduga adalah proses fagositosis dari sel yang telah mengalami nekrosis. Kematian sel akibat nekrosis disebabkan organel sel mengalami pembengkakan sehingga sel akan meledak dan mengeluarkan seluruh isi sel menuju ruang ekstraseluler. Selanjutnya makrofag menelan debris sel nekrosis melalui

fagositosis dan selanjutnya mensekresikan molekul yang mengaktifkan sel-sel imunodefensif lainnya untuk memicu inflamasi (Junqueira, 2005).



Gambar 4.11. Struktur Histologi Hati. Kontrol negatif asma (K-); kontrol positif asma (K+); Asma-kecubung dosis 0.56mg/kg BB (P1A); Asma-kecubung dosis 1.12mg/kg BB (P2A); Non-asma kecubung dosis 0.56mg/kg BB (P1NA); Non-asma kecubung dosis 1.12mg/kg BB (P2NA); (insert)(400x) skala 50 $\mu$ m.

Sel-sel mononuklear, misalnya limfosit atau netrofil yang terdapat pada struktur jaringan hati, umumnya mengelilingi sel yang nekrosis. Kumpulan sel-sel ini dikenal sebagai *necrotic foci*. Hasil penelitian ini

yang menyatakan bahwa fraksi air bunga kecubung dapat memicu infiltrasi sel-sel mononuklear menuju jaringan hati, sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh El-Torki, *et al.*, (2010), yang menyatakan bahwa jaringan hati tikus yang diberikan *crude-extract* air daun kecubung (*Datura metel*) menunjukkan adanya infiltrasi sel-sel mononuklear pada jaringan hepar. *Necrotic foci* terdiri atas sel-sel mononuklear, merupakan salah satu efek samping pemberian fraksi air bunga kecubung. Efek samping ditemukan pada jaringan hati hewan coba yang pernah di terapi, baik oleh obat-obatan kimia maupun pengobatan alami dalam dosis yang direkomendasikan. Namun, sepanjang efek samping tersebut dapat diterima dan belum menyebabkan gangguan serta kerusakan fungsi organ, pemberian terapi dapat dilakukan (El-Torki, *et al.*, 2010).



## BAB V KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Fraksi air bunga kecubung (*Datura metel* Linn.) mampu memicu aktivitas imunokompeten pada mencit model asma. Hal ini dibuktikan melalui peningkatan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang mengindikasikan bahwa sel T naïve kembali meningkat dan tidak berdiferensiasi menjadi sel efektor pasca pemberian fraksi air bunga kecubung. Hasil ini didukung oleh penurunan tingkat inflamasi yang ditandai oleh penurunan CD8<sup>+</sup>.
2. Dosis optimum fraksi air bunga kecubung yang aman digunakan untuk terapi asma adalah 0.56 mg/kg BB.
3. Pemberian fraksi air bunga kecubung dosis 0.56mg/kg BB dapat memperbaiki gambaran histologi saluran bronkiolus, melalui pengurangan penebalan otot polos.
4. Fraksi air bunga kecubung dosis 1.12mg/kg BB menimbulkan efek toksisitas berdasarkan gambaran histopatologi jaringan hati.

### 5.2. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah

1. Penting dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan bunga kecubung yang berperan dalam penyembuhan asma.
2. Penting dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi fraksi air bunga kecubung dalam memicu aktivitas imunokompeten organ limfoid lainnya, sebagai konfirmasi keamanan herbal sebagai terapi penyembuhan penyakit.
3. Penelitian untuk mengkonfirmasi fungsi sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pasca pemberian fraksi air bunga kecubung sebagai sel T regulator menggunakan marker Foxp3.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., dan A.H. Lichtman. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. W.B. Saunders Company. California.
- Abubakar, M. G., U. Z. Suleiman, A. S. Frank, dan A. N. Ukwuani. 2010. Hallucinogenic Effects Of Aqueous Seeds Extract Of *Datura Metel* In Rats. *The Internet Journal of Pharmacology* 1(9).
- Akbari, O., L. John, M.D. Faul, E. G. Hoyte, G. J. Berry, J. Wahlström, M. Kronenberg, R.H. DeKruyff, dan D.T. Umetsu. 2006. CD4<sup>+</sup> Invariant T-Cell–Receptor<sup>+</sup> Natural Killer T Cells in Bronchial Asthma. *The New England Journal of Medicine*.
- Albab, F. A. 2009. Perubahan Kuantitatif Interleukin 4, Sel B220<sup>+</sup> dan Sel T CD4<sup>+</sup> Sumsum Tulang Serta Histopatologi Hati Mencit BALB/c *Splenectomy* Pasca Paparan *Salmonella typhi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
- Alexander J., D. Benford, A. Cockburn, J.P. Cravedi, E. Dogliotti, A.E. Domenico, M.R. Fernández-Cruz, P. Fürst, J. Fink-Gremmels, C.L. Galli, P. Grandjean, J. Gzyl, G. Heinemeyer, N. Johansson A. Mutti, J. Schlatter, R. Leeuwen, C.V. Peteghem, dan P. Verger. 2008. Tropane Alkaloids (From *Datura* sp.) as Undesirable Substances in Animal Feed. The European Food Safety Authority.
- Amin, M. H. F. 2009. Mekanisme Imunoneuromodulasi Terapi “*Assisted Drainage*” pada Reaksi Tikus Alergi yang Terpapar Lipolisakarida dan *Porphyromonas gingivalis*. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.
- Autumn Belle. com. 2011. *Datura metel* Wordless Wednesday. <http://www.autumn Belle@mynicegarden.blogspot.com>. Tanggal akses 20 Juni 2011.
- Backer dan V.Brink. 1965. Flora of Java. Vol. II. 464-478.
- Baratawidjaja, K. G. 2006. Imunologi Dasar-Jilid ke-Tujuh. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Belmonte, K. E. 2005. Cholinergic Pathways in the Lungs and Anticholinergic Therapy for Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
- Campbell, N.A., J. B. Reece, dan L. G. Mitchell. 2004. Biologi-Edisi kelima-Jilid III. Addison Wesley Longman, Inc.
- El-Torki, M. A., A.W. Mehdi, A. I. Mohammed, N.A. Al-Jiboori. 2010. Liver and Kidney Functions in Adult Male Rats Following

- Multiple Subcutaneous Injections of Non-Lethal Doses of Datura metel Leaves Aqueous Extract. Zoology Departement, Faculty of Science, Garyounis University, Benghazi, Libya.
- Eroschenko, V. P. 2000. Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Lippincot Williams and Wilkins Inc., U.S.A.
- Gosen, R., J. Zaagsma, H. Meurs dan A. J. halayko. 2006. Muscarinic Reseptor Signaling in the Pathophysiology of Asthma and COPD. Respiratory Research, Vol. 7 No. 73.
- Greewal, I. S., H.G. Foellmer, K. D. Greewal, H. Wang, W.P. Lee, D. Tumas, C.A. Janeway, dan R.A. Flavel. 2001. CD62L is Required on Effector Cells for Local Interactions in the CNS to Cause Myelin Damage in Experimental Allergic Encephalomyelitis. Cell Press.
- Hamelmann, E., A. Oshiba, J. Paluh, K. Bradley, J. Loader, T.A. Potter, G.L. Larsen, and E.W. Gelfand. 1996. Requirement for CD8<sup>+</sup> T Cells in the Development of Airway Hyperresponsiveness in a Marine Model of Airway Sensitization. JExp Med 183, 1719-1729.
- Hasibuan, S. R. 2009. Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Efek Analgetika Metamprion Pada Marmot (*Cavia cobaya*). Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Iskandar, Y. 2006. Tanaman Obat yang Berkhasiat Sebagai Antiasma Bronkhial. Universitas Padjajaran: Jatinangor.
- Johnson, R. Y. C., T.N. Mayadas, P.S. Frenette, R.E. Mebius, M. Subramaniam, A. Lacasce, R.O. Hynes, dan D.D. Wagner. 1995. Blood Cell Dynamic in P-selectin Deficient Mice. Cell Press.
- Junqueira, L., C. J. Carneiro, dan R.O. Kelley. 2005. Histologi Dasar. Edisi Kesepuluh. Alih Bahasa J. Tambayong. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kurniawati, A. D. 2005. Analisis Hubungan Kondisi Lingkungan Rumah dan Perilaku Keluarga dengan Kejadian Serangan Asma Anak di Kota Semarang. Program PascaSarjana, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Kutama, A. S., A. S. Muhammed, dan S. A. Kiyawa. 2010. Hallucinogenic Effect of Datura metel L. Leaf Extract in Albino Rats. Bioscience Research Communications. Vol. 22, No.4.
- Lee. J.H., H.H. Yu, L.C. Wang, Y.H. Yang, Y.T. Lin, dan B.L. Chiang. 2006. The level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regualtory T Cells In Paediatric

- Patients With Allergic Rhinitis and Bronchial Asthma. Departement of Pediatrics, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, China and Graduate Institute of Clinical Medicine, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan, Cina.
- Lin, S. J., L.Y. Chang, D.C. Yan, Y.J. Huan, T.J. Lin, dan T.Y. Lin. 2003. Decreased Intercellular Adhesion Molecule-1 (CD54) and L-selectin (CD62L) Expression on Peripheral Blood Natural Killer Cells In Asthmatic Children With Acute Exacerbation.
- Matsuzaki, S., K. Shinozaki, N. Kobayashi, dan K. Agematsu. 2004. Polarization of Th1/Th2 in Human CD4<sup>+</sup> T Cells Separated by CD62L: Analysis by Transcription Factors. Departments of Pediatrics and Infectious, Immunology, Graduate School of Medicine, Shinshu University, Matsumoto, Japan.
- Miyahara, N., B.J. Swanson, K. Takeda, C. Taube, S. Miyahara, T. Kodama, A. Dakhama, V.L. Ott, dan E.W. Gelfand. 2004. Effector CD8<sup>+</sup> T Cells Mediate Inflammation and Airway Hyper-Responsiveness. *Nat Med* 10, 865-869.
- Murch, J.M., A.R. Alan, J. Cao, dan P.K. Saxena. 2009. Melatonin and Serotonin in Flowers and Fruits of *Datura metel* L. *Journal of Pineal Research*.
- Ningtyas, W. R. 2008. Formulasi Tablet Kunyah Ekstrak Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoria* [Berg] Roscoe) dengan Kombinasi Bahan Pengisi Sorbitol –Laktosa. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Noumi, E. 2009. Ethno-medico-botanical Survey of Medicinal Plant Used in the Treatment of Asthma in the Nkongsamba Region, Cameroon.
- Okwu, E. D. dan C.E. Igara. 2009. Isolation, Characterization and Antibacterial Activity of Alkaloid From *Datura metel* Linn Leaves.
- Ong, H. C. dan M. Nordiana. 1999. Malay Ethno-medico Botany in Machang, Kelantan, Malaysia. <http://www.elsevier.com>. Tanggal akses 20 November 2010.
- Oosterhout, A. J. M. V., B.V. Esch, G. Hofman, C.L. Hofstra, I.V. Ark F.P. Nijkamp, M.L. Kapsenberg, H. F. J. Savelkoul, dan F.R. Weller. 1998. Allergen Immunotherapy Inhibits Airway Eosinophilia and Hyperresponsiveness Associated with Decreased

- IL-4 Production by Lymphocytes in a Murine Model of Allergic Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19:622–628.
- Pimentel, J.A.A. 2010. Role of Alergen-Spesific CD8<sup>+</sup> T Cells in the Murine Asthma Model. Munchen University.
- Plantamorf. com. 2010. Klasifikasi *Datura metel*, Linn. <http://www.plantamorf.com>. Tanggal akses 20 Oktober 2010.
- Restrepo, D. R. 2007. Use of Inhaled Anticholinergic Agents in Obstructive Airway Disease. *Respiratory Care*. Vol. 52 No.7
- Rifa'i, M. 2008. Sel Regulator. Muhaimin Site. <http://rifa12345.multiply.com>. Tanggal akses 20 Maret 2011.
- Rifa'i, M. 2011. Alergi dan Hipersensitif. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Braijaya, Malang.
- Rosen, L. D. 2007. An Integrative Approach to Atopic Disorders in Children. Mary Ann Liber, Inc.
- Slomianka, L. 2009. Blue Histology-Respiratory System. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia. Tanggal akses 20 Maret 2011
- Stock, P., T. Kallinich, O. Akbari, D. Quarcoo, K. Gerhold, U. Wahn, D.T. Umetsu, dan E. Hamelmann. 2004. CD8<sup>+</sup> T cells Regulate Immune Responses in a Murine Model of Allergen-Induced Sensitization and Airway Inflammation. *Eur J Immunol* 34, 1817-1827.
- Subiyantoyo, A. A. dan H.P. Diding. 2008. Pengaruh Minyak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa L.*) Terhadap Derajat Inflamasi Saluran Nafas. *Majalah Kedokteran Indonesia*.
- Szabo, C. 2000. Cell Death-The Role of Poly (ADP-ribose) Polymerase. CRC Press. United States. 40-41.
- Tedder, T.F., D.A. Steeber, A. Chen, dan P. Engel. 1995. The Selectins: Vascular Adhesion Molecules. *FASEB J.* 9, 866–873.
- Utami, I. W. 2008. Efek Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyantum* Wight) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat pada Mencit Putih (*Mus musculus*) Jantan Galur BALB/c yang Diinduksi dengan Kalium Oksonat. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Visualhistology.com. 2011. Respiratory system.  
<http://www.visualhistology.com>. Tanggal akses 20 Mei 2011.

Wahyuni, N. 2009. Perubahan Kadar Interleukin-2, Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>, dan Histopatologi Usus Halus Mencit (BALB/c) *Splenectomy* Paparan *Salmonella typhi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Yasef, A. T. 2007. Allergen Spesific Immunoterapy: The Future Cure for Allergic Asthma.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 1. Sertifikat Laik Ethik



### KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

#### KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 59-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL** : FRAKSI AIR BUNGA KECUBUNG (*Datura metel* L.)  
MEMICU AKTIVITAS IMUNOMODULATOR MENCIT  
MODEL ASMA

**PENELITI** : DEWI SATWIKA

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : JURUSAN BIOLOGI/FMIPA/ UNIVERSITAS  
BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 7 Juli 2011  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## Lampiran 2. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman



LABORATORIUM TAKSONOMI DAN STRUKTUR TUMBUHAN  
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
JALAN VETERAN, MALANG 65145  
Telepon/faks: 0341-575841

### KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0045/Takso.Ident/8/2011

Kepala Laboratorium Taksonomi dan Struktur Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Dewi Satwika  
NIM : 0710913010  
Instansi : Jurusan Biologi, FMIPA  
Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1965), volume II, halaman 464-478, diidentifikasi sebagai:

Family : Solanaceae  
Genus : *Datura L.*  
Spesies : *Datura metel var. metel L.*

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

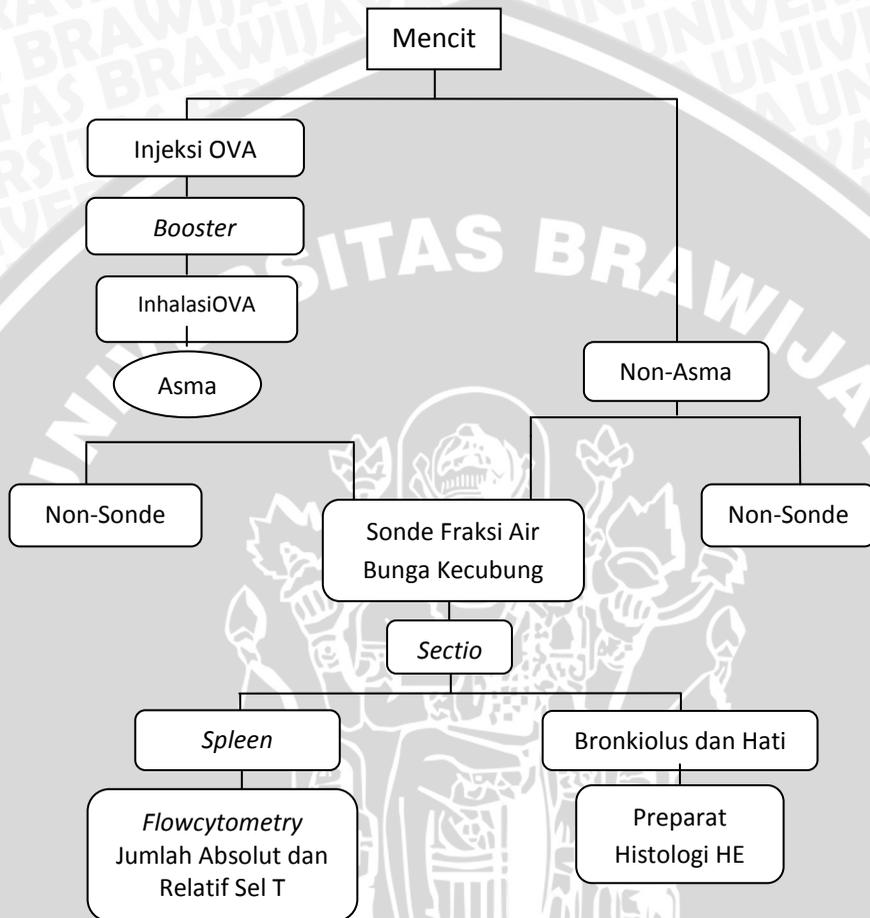
Malang, 2 Agustus 2011

Kepala Laboratorium  
Taksonomi dan Struktur Tumbuhan,



*Rudiyati Azrianingsih*  
Rudiyati Azrianingsih, MSc, PhD  
NIP. 40900128 199412 2 001

## Lampiran 2. Kerangka Operasional



Gambar 2. Kerangka Operasional Penelitian

### Lampiran 3. Komposisi Larutan

Tabel 1. Komposisi Bahan *Phosphate Buffer Saline* (PBS)

No.	Nama bahan	Jumlah
1.	NaCl	3.8 gram
2.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.55 gram
3.	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35 gram
4.	Akuades	Sampai 1 liter

Tabel 2. Komposisi Bahan *Paraformal dehyde* 4% (PFA)

No.	Nama bahan	Jumlah
1.	PFA	4 gram
2.	PBS	150 ml
3.	NaOH	

## Lampiran 4. Injeksi Ovalbumin

Misal: jumlah mencit yang akan diinjeksi 15 mencit.

- Jika volume injeksi untuk setiap mencit adalah  $200\mu\text{l}$ , maka volume yang dibutuhkan untuk 15 mencit adalah  $3000\mu\text{l}$  (3ml).
- $\text{AlOH}_3$  yang dibutuhkan untuk 15 mencit adalah 300mg

### Ovalbumin

- dibuat stok besar 1mg/ml
- ditimbang sebanyak 1mg
- dilarutkan dalam 1ml PBS steril

### Stok Ovalbumin 1mg/ml

- diambil sebanyak  $30\mu\text{l}$
- dimasukkan dalam beaker glass 5ml
- dimasukkan  $\text{AlOH}_3$  sebanyak 300 mg
- ditambahkan PBS steril sebanyak  $2970\mu\text{l}$
- distirer dengan kecepatan rendah selama 15 menit
- dimasukkan ke dalam 15 tabung effendof
- dimasukkan dalam spuit 1ml, masing-masing sebanyak  $200\mu\text{l}$

### Ovalbumin dalam spuit 1ml

- mencit dipegang dengan mencubit pada bagian tengkuk
- ekor mencit diselipkan pada sela-sela jari
- diusap perut bagian bawah dan disinfeksi dengan alkohol 70%
- diinjeksi secara intraperitoneal ke dalam bagian intraperitoneum

### Hasil

#### Keterangan:

*Booster* dilakukan 1 minggu setelah injeksi pertama

## Lampiran 5. Inhalasi Ovalbumin dengan dosis 1mg/ml

### Ovalbumin

- ditimbang sebanyak 15 mg
- dilarutkan dengan 15 ml PBS steril dalam *beaker glass*
- distirer dengan kecepatan rendah selama 15 menit
- dimasukkan dalam effendof 1ml masing-masing sebanyak 1ml

### Ovalbumin dalam effendof

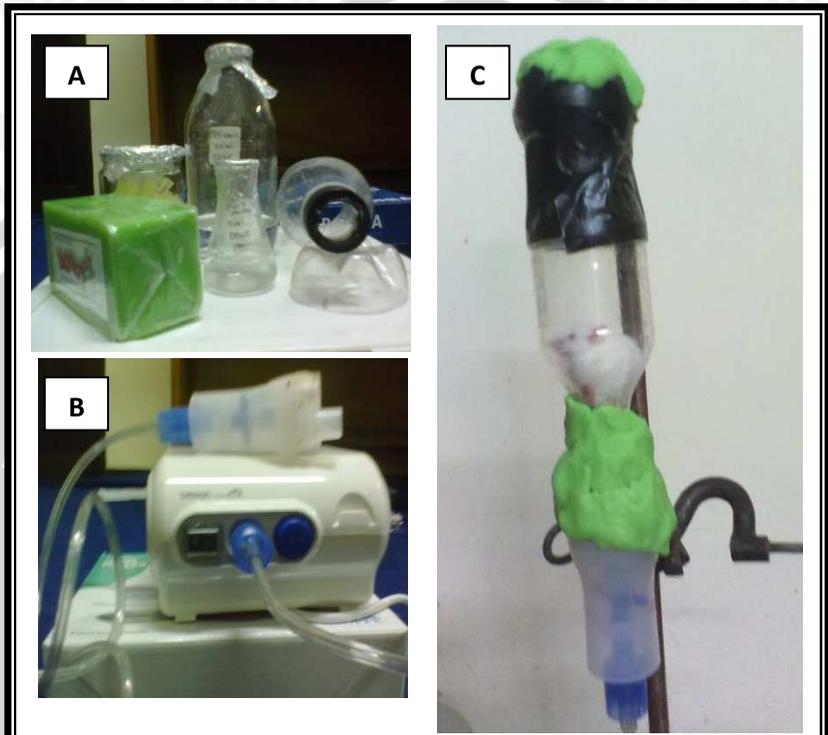
- dimasukkan dalam wadah *CompronAir Nebulizer*
- mulut wadah dihubungkan dengan tutup botol yang telah dilubangi
- bagian pangkal wadah, dihubungkan dengan selang *CompronAir Nebulizer*
- mencit dimasukkan ke dalam botol
- seluruh lubang ditutup dengan lakban hitam dan lilin malam hingga rapat
- di *turn-on* alat *CompronAir Nebulizer* selama 20 menit untuk setiap mencit

### Mencit menghirup Ovalbumin

#### **Keterangan:**

Total larutan yang dibuat dalam diagram alir diatas adalah 15 ml untuk 15 mencit

## Ilustrasi Inhalasi Ovalbumin



Gambar 4.1. Prosedur Inhalasi Ovalbumin kepada Mencit Menggunakan *CompronAir Nebulizer*; peralatan yang dibutuhkan untuk inhalasi (A); *CompronAir Nebulizer* (B); mencit diletakkan dalam botol yang telah terhubung dengan *nebulizer* (C).

## Lampiran 6. Persiapan Fraksi Air Bunga Kecubung

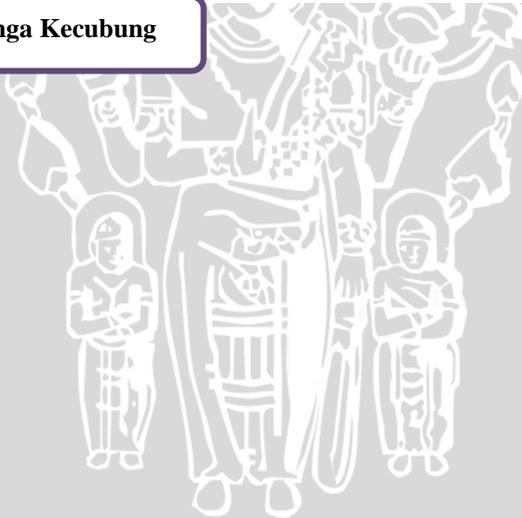
### Bunga Kecubung (*Datura metel L.*)

- dipetik dari herba kecubung
- dibersihkan dengan air mengalir
- dikeringkan dengan *tissue*
- dikeringanginkan selama 7 hari

### Bunga kecubung kering

- dihaluskan dengan mortar dan *pestle*
- dilarutkan dalam 500ml akuades
- larutan dihomogenkan menggunakan stirrer sambil direbus pada suhu 55<sup>0</sup>C

### Fraksi Air Bunga Kecubung



## Lampiran 7. Tabel Konversi Dosis Laurence dan Bacharah (1964)

Tabel L7.1. Konversi Dosis (Laurench dan Bacharach)

	Mencit 20gr	Tikus 200gr	Marmot 400gr	Kelinci 1,5kg	Kucing 2kg	Kera 4kg	Anjing 12kg	Manusia 70kg
Mencit 20gr	1.0	7.0	12.25	27.80	29.70	64.1	124.2	387.9
Tikus 200gr	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400gr	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

## Lampiran 8. Penghitungan Konsentrasi Cekok Bunga Kecubung

Penelitian Kecubung  
(Abubakar, *et al.*,  
2009)

Kecubung  
4mg/kg BB Tikus

Konversi ke mencit menggunakan Tabel  
Konversi laurench dan Bacharach (1964)  
(Lampiran 5)

Dosis pada Tikus = 4 mg/kg BB Tikus

Berat Badan Tikus (200 gram) → dikonversi ke berat badan  
mencit (20 gram) menurut Tabel konversi adalah 0.14

Dosis I:

$$4 \text{ mg} \times 0.14 = 0.56 \text{ mg/kg BB}$$

Dosis II:

$$4\text{mg} \times 0.14 \times 2 = 1.12 \text{ mg/kg BB}$$

## Lampiran 9. Isolasi *Spleen* dan Penghitungan Sel Hidup

### *Spleen*

- dipisahkan dari tubuh mencit yang telah disectio
- dicuci dalam PBS sebanyak 2X
- diletakkan dalam cawan petri yang berisi 5ml PBS
- digerus menggunakan pangkal spuit
- disaring menggunakan filter *milipore*
- dimasukkan dalam tabung propilen
- diresuspensi dengan 10ml PBS
- dimasukkan dalam tabung propilen
- disentrifugasi dengan kecepatan 2500rpm, 5 menit, suhu 4<sup>0</sup>C

### Pelet

- diresuspensi dengan 1ml PBS

### Analisa *Flowcytometry*

- diambil 5 $\mu$ l
- dimasukkan dalam 95 $\mu$ l *Tryphan Blue*
- dihitung sel hidup menggunakan *haemocytometer*

### Hasil

## Lampiran 10. Analisa *Flowcytometry*

### 50µl Pelet

Hasil sentrifugasi limpa pada protokol sebelumnya

- dimasukkan dalam tabung effendof berisi 1ml PBS
- disentrifugasi 3500rpm, 2 menit, 4°C

### Pelet

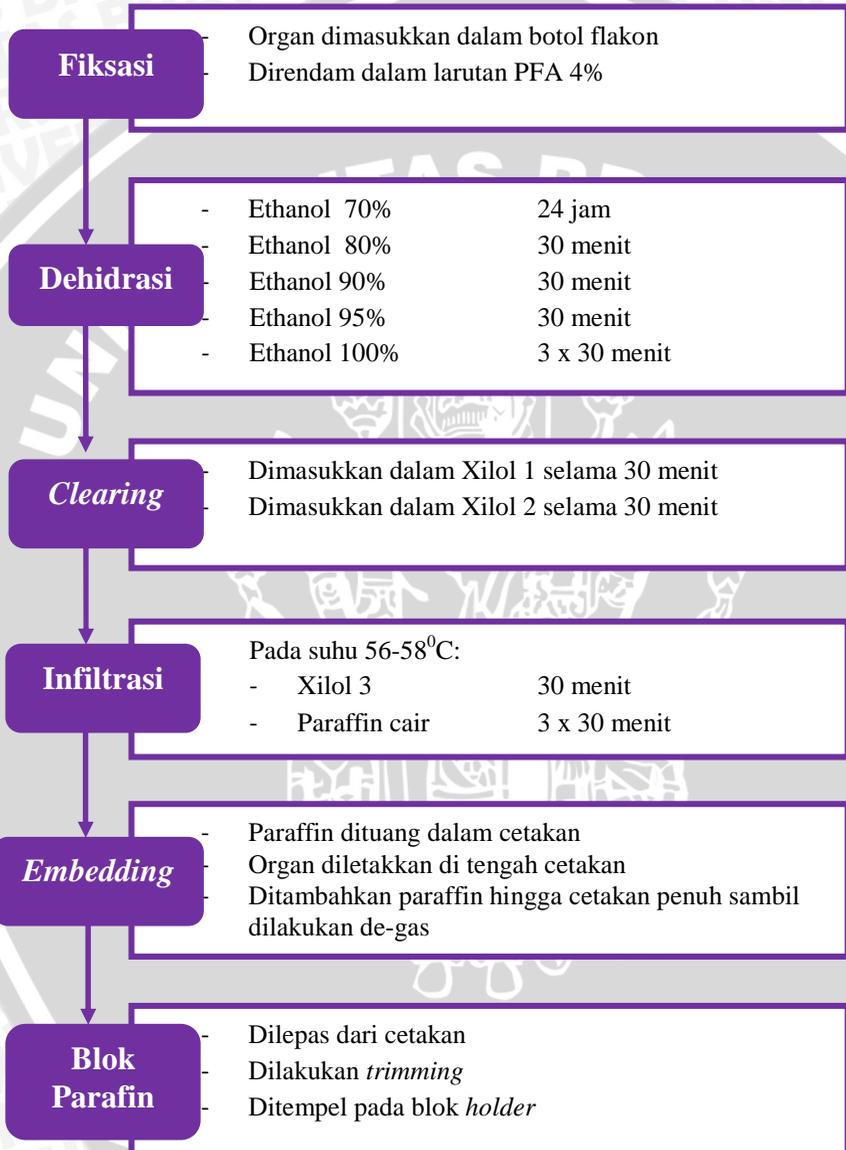
- diinkubasi dengan antibodi BD BioScience™ *antimouse CD4 FITC conjugated* dan *PE-Cy™ antimouse CD25* selama 15 menit

### Pelet (*coating antibodi*)

- diambil dan dimasukkan dalam kuvet *flowcytometer*
- ditambah 1000µl PBS steril
- kuvet dipasang pada *nozzle* BD FACSCalibur™ *flowcytometer*
- dilakukan setting computer dengan software BD Cell Quest Pro™
- dilakukan koneksi komputer dengan *flowcytometer*
- dirunning larutan dalam *nozzle flowcytometer*

### Hasil

## Lampiran 11. Pembuatan Preparat dengan Pewarnaan HE (Albab, F.A. 2009)



## Sectioning

- Diiris setebal 5µm dengan mikrotom

## Pita Irisan

- Diambil dengan kuas
- Diletakkan dalam air hangat 38-40<sup>0</sup>C dalam water bath
- Diambil dengan gelas objek hingga menempel diatasnya
- Gelas objek diletakkan diatas hotplate dan dikeringkan

## Deparafinasi

- Dideparafinasi dalam Xilol sebanyak 2x10 menit
- Direhidrasi dalam ethanol bertingkat (EtOH abs, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 30% @ 5 menit )
- Dicuci dengan akuades mengalir selama 5 menit

## Hematoksilen

- Direndam dalam hematoksilen selama 10 detik
- Dicuci dengan akuades mengalir selama 5 menit
- Direndam dalam ethanol bertingkat (30%, 60%, 70%, @ 5 menit)

## Eosin

- Direndam dalam eosin selama 10 menit
- Direhidrasi dalam ethanol bertingkat (70%, 60%, 30%, @ 5 menit)
- Di clearing dengan xilol selama 3x5 menit
- Mounting dengan enthelan

**Lampiran 12. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD Jumlah Reaktif Sel T CD4<sup>+</sup> pada Organ *spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

Tabel L12.1. Hasil Uji ANOVA untuk Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>

ANOVA					
CD4					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	266.698	5	53.340	8.572	.001
Within Groups	74.671	12	6.223		
Total	341.370	17			

Tabel L12.2. Hasil Uji Tukey untuk Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>

CD4				
Tukey HSD				
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol negatif	3	12.4450		
Asma-kecubung 0.56mg/kg BB	3	13.0900		
Non-Asma kecubung 1.12km/kg BB	3	15.1600	15.1600	
Asma kecubung 1.12km/kg BB	3	18.6450	18.6450	18.6450
Non- Asma-kecubung 0.56mg/kg BB	3		20.0800	20.0800
Kontrol positif	3			23.1100
Sig.		.084	.225	.308

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 13. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD Jumlah Absolute sel T CD4<sup>+</sup> pada organ *spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

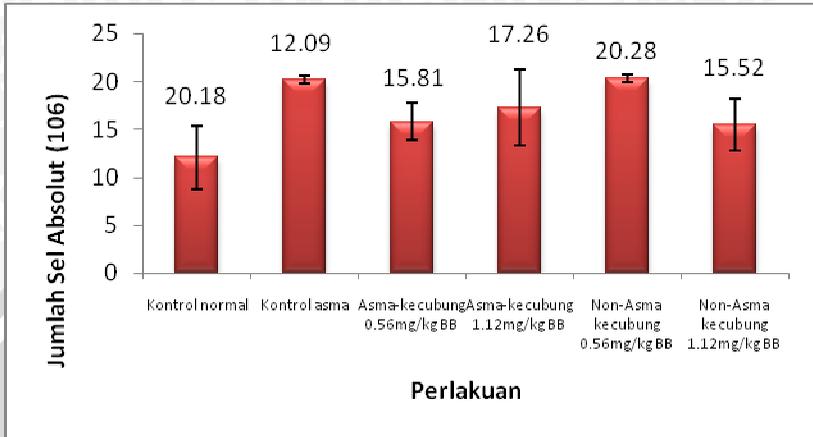
Tabel L13.1. Hasil Uji ANOVA untuk Jumlah Absolut sel T CD4<sup>+</sup>

ANOVA					
CD4					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.456E14	5	2.911E13	4.603	.014
Within Groups	7.589E13	12	6.325E12		
Total	2.215E14	17			

Tabel L13.2. Hasil Uji Tukey HSD untuk Jumlah Absolut sel T CD4<sup>+</sup>

CD4			
Tukey HSD			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Negatif	3	1.21E7	
Non-Asma Kecubung 1.12mg/kg BB	3	1.55E7	1.55E7
Asma-kecubung 0.56 mg/kg BB	3	1.58E7	1.58E7
Asma-kecubung 1.12mg/kg BB	3	1.73E7	1.73E7
Kontrol positif	3		2.02E7
Non-asma kecubung 0.56mg/kg BB	3		2.03E7
Sig.		.194	.260

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Gambar L13.1. Jumlah Absolut Sel T CD4<sup>+</sup> pada *Spleen*. Keterangan : K+ = kontrol positif asma; K- = kontrol negative asma; P1A = Asma- kecubung 0.56mg/kg BB; P2A = Asma-kecubung 1.12mg/kg BB; P1NA = Non-Asma-kecubung 0.56mg/kg BB; P2NA= Non-asma-kecubung 1.12mg/kg BB.

**Lampiran 14. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD  
Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup> pada Organ *spleen* Melalui  
Software SPSS 16.0 for Windows.**

Tabel 14.1. Hasil Analisis ANOVA untuk Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup>

ANOVA					
CD8					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2689.713	5	537.943	25.083	.000
Within Groups	257.354	12	21.446		
Total	2947.066	17			

Tabel 14.2. Hasil Analisis Tukey HSD untuk Jumlah Relatif Sel T CD8<sup>+</sup>

CD8			
Tukey HSD			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Non-Asma Kecubung 1.12mg/kg BB	3	12.1300	
Kontrol Negatif	3	15.2000	
Non-Asma kecubung 0.56mg/kg BB	3	16.1400	
Asma-kecubung 0.56mg/kg BB	3	17.6450	
Asma-kecubung 1.12mg/kg BB	3	18.1250	
Kontrol Positif	3		48.2300
Sig.		.622	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 15. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD Jumlah Absolut Sel T CD8<sup>+</sup> pada Organ *spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

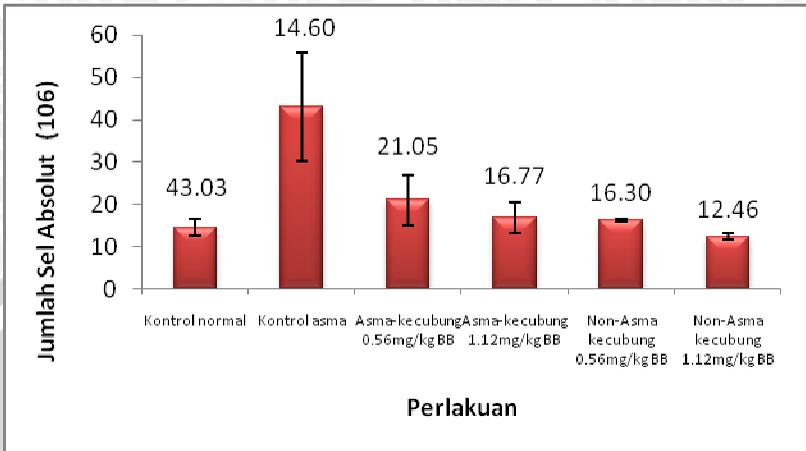
Tabel L15.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Absolut Sel T CD8<sup>+</sup>

ANOVA					
CD8					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.917E15	5	3.833E14	10.748	.000
Within Groups	4.280E14	12	3.566E13		
Total	2.345E15	17			

Tabel L15.2. Hasil Uji Tukey Jumlah Absolut Sel T CD8<sup>+</sup>

CD8			
Tukey HSD			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Non-Asma kecubung 1.12mg/kg BB	3	1.25E7	
Kontrol Negatif	3	1.46E7	
Non-Asma Kecubung 0.56mg/kg BB	3	1.63E7	
Asma-kecubung 1.12mg/kg BB	3	1.68E7	
Asma-kecubung 0.56mg/kg BB	3	2.11E7	
Kontrol Negatif	3		4.30E7
Sig.		.521	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Gambar L15.1. Jumlah Absolut Sel T CD8<sup>+</sup> pada *Spleen*. Keterangan : K<sup>+</sup> = kontrol positif asma; K<sup>-</sup> = kontrol negative asma; P1A = Asma- kecubung 0.56mg/kg BB; P2A = Asma-kecubung 1.12mg/kg BB; P1NA = Non-Asma-kecubung 0.56mg/kg BB; P2NA= Non-asma-kecubung 1.12mg/kg BB.

**Lampiran 16. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Organ *spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

Tabel L16.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>

ANOVA					
CD4CD62L					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1108.160	5	221.632	3.358	.040
Within Groups	791.947	12	65.996		
Total	1900.107	17			

Tabel L16.2. Hasil Analisis Tukey HSD Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>

CD4CD62L			
Tukey HSD			
Perlakuan	N	Subset for alpha =	
		0.05	
		1	2
Kontrol Positif	3	9.2201	
Asma-Kecubung 1.12mg/kg BB	3	19.6639	19.6639
Kontrol Negatif	3	20.2844	20.2844
Non-Asma Kecubung 0.56mg/kg BB	3	27.7568	27.7568
Asma-kecubung 0.56mg/kg BB	3	29.0856	29.0856
Non-Asma Kecubung 1.12mg/kg BB	3		33.0764
Sig.		.091	.385

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 17. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD Jumlah Absolut Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Organ *spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

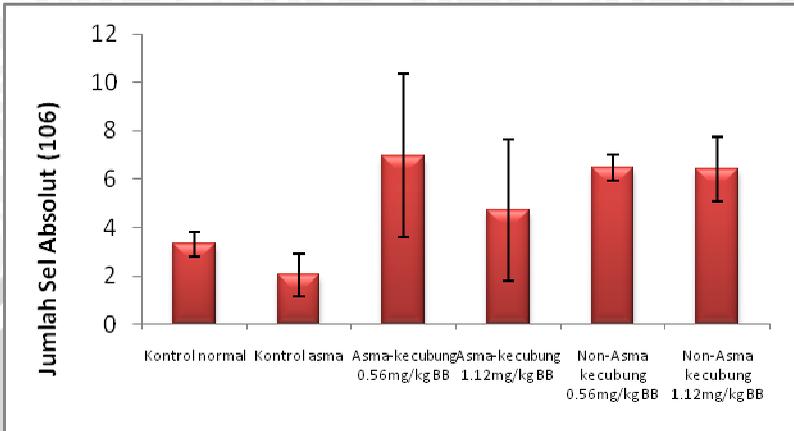
Tabel L17.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Absolut Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>

ANOVA					
CD4CD62L					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.674E15	5	3.347E14	3.584	.033
Within Groups	1.121E15	12	9.340E13		
Total	2.794E15	17			

Tabel L17.2. Hasil Analisis Tukey Jumlah Absolut Sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>

CD4CD62L			
Tukey HSD			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Positif	3	8.35E6	
Asma-Kecubung 1.12mg/kg BB	3	1.82E7	1.82E7
Kontrol negative	3	1.93E7	1.93E7
Non-Asma kecubung 0.56mg/kg BB	3	2.80E7	2.80E7
Non-Asma Kecubung 1.12mg/kg BB	3	3.44E7	3.44E7
Asma-kecubung 0.56mg/kg BB	3		3.55E7
Sig.		.055	.307

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Gambar L14.1. Jumlah Absolut Sel T  $CD4^+CD62L^+$  pada *Spleen*. Keterangan : K+ = kontrol positif asma; K- = kontrol negative asma; P1A = Asma- kecubung 0.56mg/kg BB; P2A = Asma-kecubung 1.12mg/kg BB; P1NA = Non-Asma-kecubung 0.56mg/kg BB; P2NA= Non-asma-kecubung 1.12mg/kg BB.

**Lampiran 18. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pada Organ *spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

Tabel L18.1. Hasil Analisis ANOVA Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

ANOVA					
CD4CD25					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	515.220	5	103.044	5.306	.008
Within Groups	233.028	12	19.419		
Total	748.248	17			

Tabel L18.2. Hasil Analisis Uji Tukey Jumlah Relatif Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

CD4CD25			
Tukey HSD			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Asma-Kecubung1.12mg/kg BB	3	8.8739	
Kontrol Negatif	3	17.1748	17.1748
Asma-Kecubung 0.56mg/kg BB	3	17.9013	17.9013
Kontrol Positif	3		22.5178
Non-Asma Kecubung 1.12mg/kg BB	3		23.4492
Non-Asma Kecubung 0.56mg/kg BB	3		24.7059
Sig.		.196	.351

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 19. Hasil Analisis Ragam ANOVA Uji Lanjut Tukey HSD Jumlah Absolut Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pada Organ *spleen* Melalui Software SPSS 16.0 for Windows.**

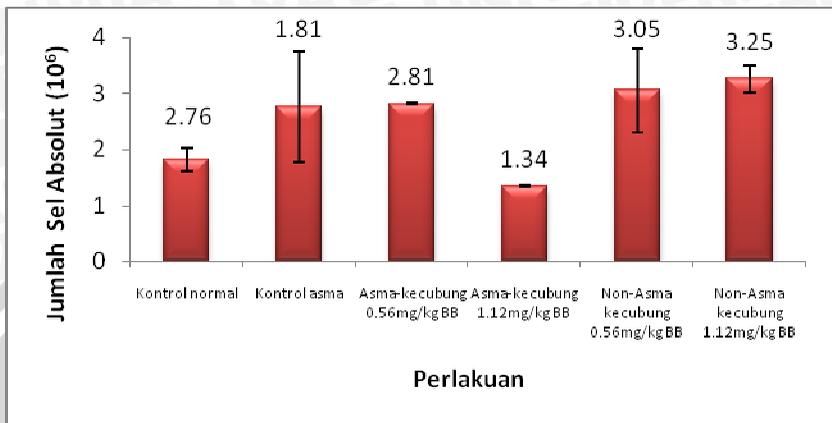
Tabel L19.1. Hasil Analisis Jumlah Absolut Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

ANOVA					
CD4CD25					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.714E14	5	1.143E14	5.404	.008
Within Groups	2.537E14	12	2.114E13		
Total	8.251E14	17			

Tabel L19.2. Hasil Analisis Uji Tukey Jumlah Absolut Sel T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

CD4CD25			
Tukey HSD			
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Asma 1.12mg/kg BB	3	8.21E6	
Kontrol Negatif	3	1.64E7	1.64E7
Kontrol Positif	3	2.02E7	2.02E7
Asma 0.56mg/kg BB	3		2.15E7
Non-Asma 1.12mg/kg BB	3		2.41E7
Non-Asma 0.56mg/kg BB	3		2.48E7
Sig.		.066	.289

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Gambar 19.1. Jumlah Absolut Sel T  $CD4^+CD25^+$  pada *Spleen*.  
 Keterangan : K+ = kontrol positif asma; K- = kontrol negative asma; P1A = Asma-kecubung 0.56mg/kg BB; P2A = Asma-kecubung 1.12mg/kg BB; P1NA = Non-Asma-kecubung 0.56mg/kg BB; P2NA= Non-asma-kecubung 1.12mg/kg BB.