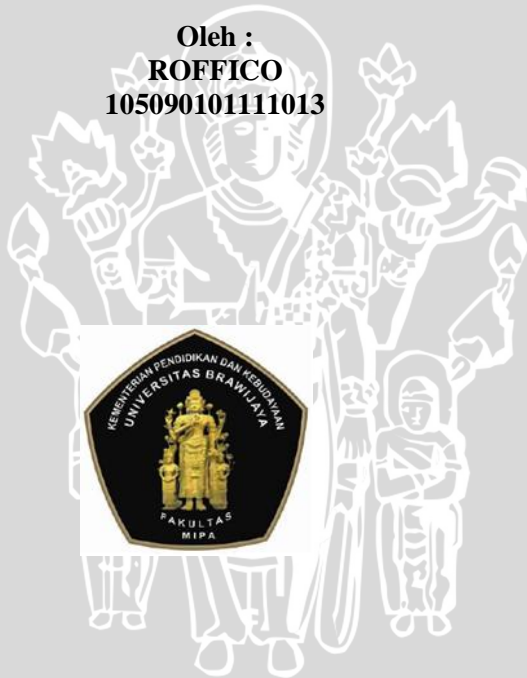


**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN
Polyscias obtusa DAN *Elephantopus scaber* TERHADAP
MODULASI SEL T CD4+ DAN CD8+ PADA MENCIT BUNTING
BALB/c**

SKRIPSI

Oleh :
ROFFICO
105090101111013



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN
Polyscias obtusa DAN *Elephantopus scaber* TERHADAP
MODULASI SEL T CD4+ DAN CD8+ PADA MENCIT BUNTING
BALB/c**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam
bidang biologi

Oleh :
ROFFICO
105090101111013



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN
Polyscias obtusa DAN *Elephantopus scaber* TERHADAP
MODULASI SEL T CD4+ DAN CD8+ PADA MENCIT BUNTING
BALB/c**

oleh :
ROFFICO
105090101111013

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 10
Juli 2014 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Sains dalam bidang biologi**

Pembimbing

Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS
NIP. 19610304 199403 1 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih.,MSc.PhD
NIP. 19700128 1994122 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : ROFFICO
NIM : 105090101111013
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi berjudul : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN *Polyscias obtusa* DAN *Elephantopus scaber* TERHADAP MODULASI SEL T CD4+ DAN CD8+ PADA MENCIT BUNTING BALB/c**

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.
2. Apabila dikemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Juli 2014
Yang menyatakan,

(ROFFICO)
NIM. 105090101111013

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL DAUN
Polyscias obtusa DAN *Elephantopus scaber* TERHADAP
MODULASI SEL T CD4+ DAN CD8+ PADA MENCIT BUNTING
BALB/c**

Roffico¹, Djati, MS¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2014

ABSTRAK

Tanaman yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai obat dalam pengobatan tradisional adalah Kedondong Laut (*Polyscias obtusa*) dan Tapak Liman (*Elephantopus scaber*. L). Tanaman Kedondong Laut (*Polyscias obtusa*) dan Tapak Liman (*Elephantopus scaber*. L) mengandung senyawa aktif yang dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana efek dari ekstrak etanol daun *Polyscias obtusa* dan *Elephantopus scaber*. L terhadap ekspresi sel T CD4+ dan CD8+ pada mencit bunting BALB/c. Berdasarkan hasil, terlihat *p-value* Perlakuan sebesar 0,165 (>0,05). Hal ini berarti rata-rata jumlah relatif sel T tidak berbeda secara nyata untuk perlakuan yang diberikan pada mencit bunting BALB/c. Berdasarkan hasil output *Tukey Test* dan subset yang terbentuk terlihat bahwa jumlah relatif sel T tidak berbeda nyata untuk perlakuan yang diberikan pada mencit bunting BALB/c. Kemudian, terlihat bahwa *p-value* waktu pembedahan sebesar 0,013 (<0,05). Hal ini berarti rata-rata jumlah relatif sel T memang berbeda secara nyata untuk tiap waktu pembedahan. Berdasarkan hasil output *Tukey Test* dan subset yang terbentuk terlihat bahwa jumlah relatif sel T tidak berbeda nyata terhadap waktu pembedahan. Kenaikan dan penurunan jumlah sel T CD4+ dan CD8+, kemungkinan karena aktivitas biologis senyawa yang terkandung dalam *P.obtusa* yaitu panaxidol dan stigmasterol dalam *E.scaber* yang dapat bertindak sebagai immunosupresan dan immunomodulasi. Dosis optimum ekstrak etanol daun *P.obtusa* dan *E.scaber* dalam peningkatan sel limfosit belum dapat ditentukan.

Kata kunci : *Elephantopus scaber*, limfosit, *Polyscias obtusa*

THE EFFECT OF ETHANOL EXTRACT *Elephantopus scaber* AND *Polyscias obtusa* LEAVES FOR MODULATION CD4+ AND CD8+ T CELL IN PREGNANT MICE BALB/c

Roffico¹, Djati, MS¹

¹Biology Department, Faculty of mathematics and science, Brawijaya
University, 2014

ABSTRACT

Plants that have the potential to be used as a drug in traditional medicine is Kedondong Laut (*Polyscias obtusa*) and Tapak Liman (*Elephantopus scaber*. L). Kedondong Laut plants (*Polyscias obtusa*) and Tapak Liman (*Elephantopus scaber*. L) contain active compounds that can affect the body's defense mechanisms. This study aims to determine how the effects of the ethanol extract of the *Polyscias obtusa* and *Elephantopus scaber* L. leaves on the expression of CD4+ and CD8+ T cells in pregnant mice strain BALB/c. Then the data flow cytometry results were analyzed statistically. Based on the results, show that p-value treatments of 0, 165 (> 0.05). This means that the average relative number of T cells was not significantly different for the treatment given to pregnant mice BALB /c. Based on the results of the Tukey test output and the subset that forms seen that the relative number of T cells was not significantly different for the treatment given to pregnant mice BALB /c. Then, it is seen that the p-value of 0.013 at the time of surgery (<0.05). This means that the average relative number of T cells was significantly different for each time of surgery. The increase and decrease in the number of CD4+ and CD8+ T cells, possibly due to the biological activity of compounds contained in *P.obtusa* is panaxidol and stiqmasterol in *E.scaber* that can act as an immunosuppressant and immunomodulating. The optimum dose of ethanol extract of *E.scaber* leaves and *P.obtusa* can increase lymphocyte cells could not be determined.

Keywords : *Elephantopus scaber*, lymphocytes, *Polyscias obtusa*

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah, penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas berkat, rahmat, taufik dan hidayah-Nya penyusunan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Ethanol Daun *Polyscias obtusa* Dan *Elephantopus scaber* Terhadap Modulasi Sel T CD4⁺ Dan CD8⁺ Pada Mencit Bunting BALB/c” dapat diselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penulisan skripsi ini banyak mengalami kendala, namun berkat bantuan, bimbingan, kerjasama dari berbagai pihak dan berkah dari Allah SWT sehingga kendala yang dihadapi tersebut dapat diatasi. Untuk itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada Bapak Dr. Ir. Moch. Sasmito Djati, MS selaku pembimbing yang telah dengan sabar, tekun, tulus dan ikhlas meluangkan waktu, tenaga dan pikiran memberikan bimbingan, motivasi, arahan dan saran yang berharga kepada penulis selama menyusun skripsi.

Selanjutnya ucapan terima kasih penulis sampaikan pula kepada :

1. Kedua Orang Tua serta adik tersayang “Tri Diah Rini”, “Abdullah” dan “Varda Fember” yang telah banyak memberi support serta mendo’akan demi kelancaran dan kemudahan bagi penulis.
2. Teman tercinta “ Elfrida (Fida)” dan “Kharisma Tika (Tika)” yang telah memberi dukungan everytime.

Akhirnya, dengan segala kerendahan hati penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan, sehingga penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang bersifat membangun demi kesempurnaan skripsi ini.

Malang, Juli 2014

Roffico

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	i
HALAMAN PERNYATAAN	ii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iii
ABSTRAK / ABSTRACT	iv-v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Aktivitas Imunomodulator	4
2.2 Kedondong Laut (<i>Polyscias obtusa</i>)	5
2.3 Tanaman Obat Tapak Liman	7
2.4 Organ Sistem Imun	8
2.5 Imunitas Seluler	10
2.6 Organ <i>spleen</i>	11
2.7 Kebuntingan Hubungannya dengan Sistem Imun	12
2.8 <i>Salmonella typhimurium</i>	14
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat	16
3.2 Prosedur Penelitian	16
3.2.1 Deskripsi Hewan Coba	16
3.2.2 Perlakuan Hewan Coba	16
3.2.3 Pembuatan Ekstrak Ethanol <i>E.scaber</i> dan <i>P.obtusa</i>	17

3.2.4 Uji Konfirmasi Isolat Bakteri	
<i>S.typhimurium</i>	18
3.2.4.1 Uji Media BSA	18
3.2.4.2 Uji Katalase	18
3.2.4.3 Uji Pewarnaan Cat Gram	18
3.2.4.4 Uji KIA dan LIA.....	19
3.2.4.5 Kurva Pertumbuhan	19
3.2.4.6 Kurva Standar	19
3.2.4.7 Uji Patogenitas.....	20
3.2.5 Pembuatan Isolat <i>S.typhimurium</i>	
untuk Injeksi	20
3.2.6 Isolasi Sel Limfosit dari Organ	
<i>Spleen</i>	21
3.2.7 Analisis Kuantitatif Sel T CD4 ⁺	
dan CD8 ⁺ Menggunakan	
<i>Flowcytometry</i>	21
3.2.8 Analisis Data.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Analisis Jumlah Relatif Sel T	
CD4 ⁺ dan CD8 ⁺	23
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	33

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1 Kelompok Perlakuan	16
Tabel 3.2 Perbandingan Stok Bakteri <i>S. Typhimurium</i> dengan Media Steril	20
Tabel 1. Hasil uji Normalitas data jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+	33
Tabel 2. Hasil uji Homogenitas data jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+	33
Tabel 3. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap Perlakuan.....	34
Tabel 4. Hasil uji Tukey jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap Perlakuan	34
Tabel 5. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap waktu pembedahan	35
Tabel 6. Hasil uji Tukey jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap waktu pembedahan	35



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tanaman Kedondong Laut.....	6
Gambar 2. Tanaman Tapak Liman	7
Gambar 3. Skema mekanisme kerja imunitas seluler	10
Gambar 4. Anatomi Organ <i>spleen</i>	12
Gambar 5. Perubahan keseimbangan antara stimulasi sistem imun dan penekanan sistem imun selama kehamilan	13
Gambar 6. Skema komplikasi dalam kehamilan.....	14
Gambar 7. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ dari hasil analisis Flowcytometry pada organ <i>spleen</i> pembedahan hari ke-14.....	23
Gambar 8. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ dari hasil analisis Flowcytometry pada organ <i>spleen</i> pembedahan hari ke-18	24
Gambar 9. Perubahan Jumlah relatif sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ terhadap perlakuan pada organ <i>spleen</i> ..	25
Gambar 10. Perubahan Jumlah relatif sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ terhadap waktu pembedahan hari ke-14 dan hari ke-18 pada organ <i>spleen</i>	26
Gambar 11. Morfologi <i>Vaginal Plug</i> pada Mencit	36
Gambar 12. Morfologi Mencit Kebuntingan Hari ke-18 ...	36
Gambar 13. Berat badan Mencit hingga hari kebuntingan ke-14	37
Gambar 14. Berat badan Mencit hingga hari kebuntingan ke-18	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Uji Normalitas Data	33
Lampiran 2. Uji Homogenitas	33
Lampiran 3. Hasil Analisis Statistika jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ Melalui Software SPSS 16 for Windows.....	34
Lampiran 4. <i>Vaginal Plug</i> pada Mencit Betina.....	36
Lampiran 5. Pembedahan Mencit Hari Kebuntingan ke-18 Hari.....	36
Lampiran 6. Berat Badan Mencit Perlakuan.....	37



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara imunologi, saluran reproduksi bekerja bersama-sama dengan sistem imun pada mukosa jaringan di saluran pernafasan dan pencernaan. Kebuntingan berhubungan erat dengan respon imun maternal. Ketika antigen berada di saluran reproduksi, terjadi reaksi penolakan pertama yang dilakukan oleh sel-sel fagosit dari sistem imun *innate*. Suasana asing bagi konseptus disebabkan oleh gen dari paternal yang dianggap sebagai protein asing bagi tubuh maternal. Plasenta fetus mampu memperkecil sifat keasingan bagi ibunya. Selain itu, ketika terjadi kebuntingan tubuh maternal lebih rentan terhadap patogen yang masuk (Saito, 2010). Salah satunya yaitu bakteri *Salmonella*, yang dapat menyebabkan demam tifoid, mampu menyebabkan keguguran dan resiko kematian.

Senyawa yang bersifat sebagai imunostimulan bagi tubuh, diperlukan bagi sel imunokompeten. Senyawa ini tidak boleh menyebabkan efek toksik bagi tubuh maternal maupun fetus, sehingga dapat meningkatkan proliferasi dari sel imunokompeten (Spelman, 2006). Sel yang berperan dalam sistem imun salah satunya yaitu sel limfosit T. Sel limfosit T mengalami pematangan pada organ timus yang merupakan organ limfoid primer dan berperan dalam imunitas seluler. Imunitas seluler berperan penting dalam melawan infeksi virus, infeksi bakteri intraseluler (seperti *Salmonella typhimurium*). Sel limfosit T akan berproliferasi menjadi beberapa subpopulasi sel T, seperti sel T helper ($CD4^+$), sel T sitotoksik ($CD8^+$), dan sel T memori. Ekspresi dari jumlah sel limfosit T ini dapat dilihat dari organ *spleen* karena merupakan organ limfoid sekunder. Organ limfoid sekunder merupakan organ limfoid perifer tempat terjadinya penangkapan antigen oleh sel-sel imunokompeten. Organ *spleen* bertugas mengumpulkan antigen dari darah, mengumpulkan dan menghancurkan darah merah yang telah kehilangan fungsi (Mebius, 2005).

Berdasarkan uraian diatas, senyawa yang mampu bersifat sebagai imunostimulan bagi sel imunokompeten dapat diperoleh dari tumbuhan. Senyawa ini dapat diperoleh dari tumbuhan yang berpotensi sebagai obat herbal. Tumbuhan yang berpotensi dijadikan sebagai obat herbal yaitu *Polyscias obtusa* dan *Elephantopus scaber*.

Tumbuhan tersebut dapat dijadikan alternatif dalam pengobatan tradisional. Tumbuhan yang berpotensi tersebut perlu dilakukan uji pra-klinis terhadap hewan coba, dalam rangka untuk mengetahui aktivitas biologis dari komponen senyawa aktif di dalamnya (Daisy, 2010).

Tumbuhan Kedondong Laut (*Polyscias obtusa*) dan Tapak Liman (*Elephantopus scaber*. L) mengandung senyawa aktif yang mampu mempengaruhi mekanisme pertahanan tubuh (Mohan, 2010; Pinca, 2013). Mekanisme pertahanan alamiah tubuh itu meliputi reaksi-reaksi spesifik maupun reaksi non-spesifik yang berperan dalam proses eliminasi penyebab penyakit, dan mikroba (Abbas, 2005). Pengaruh senyawa aktif dalam tumbuhan tersebut dapat bersifat meningkatkan (stimulasi), dapat pula bersifat menurunkan (supresi) dan mengembalikan (restorasi) derajat imunitas (Abbas, 2005). Berdasarkan penelitian sebelumnya, ternyata simplisia daun *Polyscias obtusa* dapat memobilisasi *haematopoietic stem cells* (CD34, sel T CD4, CD8, CD25, dan sel CD62L) pada mencit dan unggas yang diinfeksi *S. thypii*. Daun *Polyscias obtusa* juga dapat meningkatkan ketahanan tubuh pada ayam. Daun pada tanaman ini memiliki kandungan asam *oleanic* saponin (Kurnianingtyas, 2013; Farsely, 2013; Pinca, 2013).

Tanaman *Polyscias obtusa* dimungkinkan mampu meningkatkan imunitas hewan tersebut. Tanaman yang berpotensi lainnya yaitu Tapak Liman, yang diketahui dapat mengatasi berbagai penyakit radang seperti peradangan amandel, influenza, radang tenggorok, radang mata, radang ginjal yang akut dan kronis serta radang rahim atau keputihan. Selain itu, Tapak Liman juga berfungsi sebagai peluruh kencing, penurun panas, peluruh dahak, antioksidan, dan penambah darah. Tapak liman juga berguna untuk mengatasi cacar air, kurang darah (anemia) (Mohan, 2010). Tumbuhan Tapak Liman ini dimungkinkan dapat membangun kembali kondisi pemulihan dari tubuh maternal. Tujuan penelitian ini yaitu ingin mengetahui bagaimana efek dari kombinasi ekstrak etanol daun *Polyscias obtusa* dan daun *Elephantopus scaber*. L terhadap ekspresi sel CD4⁺, CD8⁺ pada mencit bunting strain BALB/c.

Kombinasi efek dari obat herbal dapat menjadi immunosupresan maupun imunomodulasi terhadap sel limfosit (U.S. Department of Health and Human Services, 2012). Efek pemberian obat herbal ini diharapkan dapat memodulasi sel limfosit.

Cara yang digunakan yaitu dengan memberikan *treatment* oral ekstrak ethanol dari dua tumbuhan tersebut terhadap hewan coba (Mencit BALB/C bunting) yang diinfeksi dengan patogen yaitu bakteri *Salmonella typhiimurium*. Cara untuk melihat respon imun pada mencit, diberi *phycoerythrin* (PE)-*conjugated anti-mouse* CD8 untuk melihat keberadaan sel T sitotoksik dan *fluorescein isothiocyanate* (FITC)-*conjugated anti-mouse* CD4 untuk melihat keberadaan sel T helper.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang ingin diselesaikan melalui penelitian ini yaitu :

1. Bagaimana perubahan kuantitatif sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ pada organ *spleen* pasca infeksi *S. typhiimurium*, diberi ekstrak ethanol daun *E.scaber* dan *Polyscias obtusa* secara oral pada mencit bunting BALB/c ?
2. Berapa dosis optimum ekstrak ethanol daun *E.scaber* dan daun *Polyscias obtusa* dalam peningkatan sel – sel limfosit pada mencit bunting BALB/c pasca infeksi *S. typhiimurium* ?

1.3 Tujuan

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini yaitu :

1. Mengetahui perubahan kuantitatif sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ pada organ *spleen* pasca infeksi *S. typhiimurium*, pemberian ekstrak ethanol daun *E.scaber* dan *Polyscias obtusa* secara oral pada mencit bunting BALB/c.
2. Mengetahui dosis optimum ekstrak ethanol daun *E.scaber* dan *Polyscias obtusa* dalam peningkatan sel-sel limfosit pada mencit bunting BALB/c pasca infeksi *S. typhiimurium*.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Memperkuat penelitian sebelumnya mengenai manfaat daun Tapak Liman dan daun *Polyscias obtusa* terhadap peningkatan sistem imun.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat Tapak Liman dan *Polyscias obtusa* terhadap sistem imun tubuh sehingga masyarakat mau memanfaatkannya sebagai obat tradisional.
3. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Aktivitas Imunomodulator

Mekanisme pertahanan spesifik maupun non spesifik umumnya saling berpengaruh. Hal ini berpengaruh pada beberapa sistem pertahanan mungkin terjadi, hingga mempersulit penggunaan imunomodulator dalam praktek. Obat golongan imunomodulator bekerja menurut 3 cara, yaitu melalui imunorestorasi, imunostimulasi, immunosupresi. Imunorestorasi dan imunostimulasi disebut imunopotensiasi atau *up regulation*, sedangkan immunosupresi disebut *down regulation*. Imunomodulator memiliki beberapa persyaratan khusus sebelum dipasarkan dan dikonsumsi oleh masyarakat luas. Hal ini bertujuan untuk dapat menjamin keamanan pemakaian imunomodulator agar tidak terjadi efek yang merugikan konsumen (Widiyanto, 1987).

Imunomodulator merupakan senyawa tertentu yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh baik secara spesifik maupun non spesifik dan terjadi induksi nonspesifik baik mekanisme pertahanan seluler maupun humoral. Induktor semacam ini biasanya tidak atau sedikit sekali berperan sebagai antigen, akan tetapi sebagian besar bekerja sebagai mitogen yaitu meningkatkan proliferasi sel yang berperan pada imunitas. Sel tujuan adalah makrofag, granulosit, limfosit T dan B, karena induktor imunitas ini bekerja menstimulasi mekanisme pertahanan seluler. Mitogen ini dapat bekerja langsung maupun tak langsung (misalnya melalui sistem komplemen atau limfosit, melalui produksi interferon atau enzim lisosomal) untuk meningkatkan fagositosis mikro dan makro (Widiyanto, 1987).

Imunomodulator harus memenuhi persyaratan berikut yaitu secara kimiawi murni atau dapat didefinisikan secara kimia, secara biologi dapat diuraikan dengan cepat, tidak bersifat *kanserojenik* atau *ko-kanserojenik*, baik secara akut maupun kronis tidak toksik dan tidak mempunyai efek samping farmakologik yang merugikan dan tidak menyebabkan stimulasi yang terlalu kecil ataupun terlalu besar. Imunomodulator adalah zat yang dapat mengatur sistem imun, baik berupa mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan.

Imunomodulator bekerja menurut tiga cara, yaitu melalui imunorestorasi, imunostimulasi, dan immunosupresi (Abbas, 2005).

Selain itu juga terdapat istilah imunorestorasi yang merupakan suatu cara untuk mengembalikan fungsi sistem imun yang terganggu dengan memberikan berbagai komponen sistem imun. Imunostimulasi yang juga disebut imunopotensiasi adalah cara memperbaiki fungsi sistem imun dengan menggunakan bahan yang merangsang sistem tersebut. Imunosupresan merupakan tindakan untuk memperbaiki fungsi sistem pertahanan tubuh dengan cara menekan respon imun (Abbas, 2005).

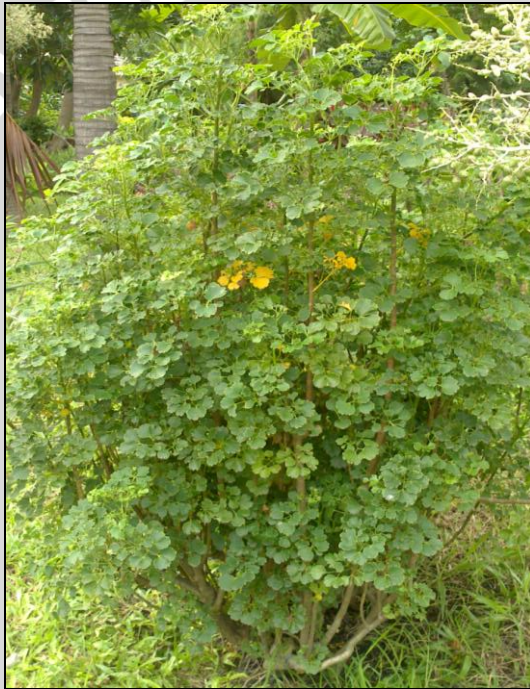
2.2 Kedondong Laut (*Polyscias obtusa*)

Menurut (Steenis, 2005), salah satu tumbuhan yang terdapat di Indonesia dan dapat dijadikan obat adalah tumbuhan kedondong laut (*Polyscias obtusa*). Tumbuhan ini dapat meningkatkan sistem imun. Daun tumbuhan ini bermanfaat untuk meluruhkan air seni, obat sakit kepala, rematik, dan digunakan dalam mengobati sistem saraf. Menurut (Istiyawati, 1994), berdasarkan pemeriksaan fitokimia pendahuluan daun kedondong laut ditemukan adanya senyawa *flavonoida*, *steroida*, *triterpenoida*, *saponin* dan tanin. Dari ekstrak etanol telah diisolasi suatu senyawa yang diduga sebagai saponin triterpenoida.

Menurut (Istiyawati, 1994), kedondong laut merupakan jenis tumbuhan yang banyak terdapat di Papua dan biasa ditanam sebagai tanaman pagar di pekarangan rumah. Tumbuhan ini juga banyak terdapat di Filipina dan diduga berasal dari Malaya, namun sekarang telah tersebar di hampir seluruh negara tropis. Kedondong laut merupakan jenis tanaman semak tegak, dengan tinggi 1 sampai 2,5 meter, memiliki daun kelipatan 3 yang berbentuk seperti bulu burung, dengan bagian atas yang memendek dengan panjang 5 sampai 10 cm. Bagian bawah daun tumbuhan ini lebih besar dari bagian atasnya, dan memiliki bentuk yang tajam serta bergerigi. Daun tumbuhan kedondong laut juga memiliki aroma yang khas.

Menurut (Compleat Botanica, 2004), berikut ini klasifikasi dari tumbuhan kedondong laut.

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Class : Dicotyledoneae
Ordo : Apiales
Famili : Araliaceae
Genus : *Polyscias*
Spesies : *Polyscias obtusa*



Gambar 1. Tanaman Kedondong Laut (Roffico, 2013)

Nama umum tumbuhan ini yaitu kedondong laut. Tumbuhan ini dikenal masyarakat Indonesia dengan nama daerah yaitu: Puding (Melayu), Kedondong laut (Sunda), Kadungdung petedhan (Madura), Bombu (Makasar), Keudem rintek (Minahasa), Gurabati (Ternate), dan Dewu papua (Ambon).

Berdasarkan studi literatur diketahui bahwa, daun tumbuhan kedondong laut mengandung *flavonoida*, *steroida* dan *triterpenoida*, saponin, tanin, asam p-hidroksi benzoat, dan asam vanilat (Istiyawati, 1994).

2.3 Tanaman Obat Tapak Liman (*Elephantopus scaber. L*)

Menurut (Mohan, 2010), tapak liman adalah salah satu tanaman yang dapat dipakai sebagai obat. Tapak Liman ini dijadikan obat tradisional, dalam keadaan segar, kering, bahkan diekstraksi dan dimasukkan ke dalam kapsul. Menurut sistematika (taksonomi) tumbuhan, kedudukan tanaman tapak liman diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta (Magnoliophyta)
Sub Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Asterales
Famili : Asteraceae (Compositae)
Genus : *Elephantopus*
Species : *Elephantopus scaber. L*



Gambar 2. Tanaman Tapak Liman (*Elephantopus scaber. L*)
(Roffico, 2013)

Secara umum sifat fisik tanaman tapak liman termasuk herba menahun, mempunyai batang bulat, kaku dan sangat liat, tinggi mencapai 10-80 cm, dan berambut kasar. Daun tunggal berkumpul pada permukaan tanah membentuk roset akar. Daun bentuknya jorong, tepi melekok dan bergerigi, ujung daun tumpul, permukaan berambut kasar, pertulangan daun menyirip, warnanya hijau tua, panjang 10 – 18 cm, lebar 3 -5 cm (Steenis, 2003). Secara ekologis habitat tapak liman tumbuh liar, kadang ditemukan dalam jumlah banyak di lapangan rumput, tepi jalan, atau pematang. Tapak liman dapat ditemukan dari dataran rendah sampai ketinggian 1.200 m dpl. Kegunaan tanaman tapak liman diantaranya dapat digunakan sebagai tanaman berkhasiat obat (Mohan, 2010).

Tanaman ini dikenal dengan nama daerah tutup bumi, balagaduk, tapak tangan atau tapak tana. Sifat kimia tumbuhan ini kaya dengan berbagai kandungan kimia yang sudah diketahui yaitu Daun : Epifrielinol, lupeol, stiqmasterol, triacontan-1-ol, dotriacontan-1-ol, lupeol acetat, deoxyelephantopin, isodeoxyelephantopin. Bunga: luteolin-7-glucoside. Kandungan zat besi pada akar dan daun tanaman tapak liman masing-masing sebesar 45,4 mg% dan 30,2 mg%. Adanya zat besi (Fe) pada daun, hal ini dapat berfungsi terutama untuk meningkatkan Hb dalam *plalam topic* pesma eritrosit. Akibat dari hal tersebut dapat memicu proliferasi dan diferensiasi pada sel induk hematopoietik untuk pembentukan sel darah merah. Hematopoiesis merupakan proses diferensiasi sel-sel stem *hematopietic* (HSC) menjadi sel-sel darah merah dan putih yang matang. Proses pada orang dewasa *hematopoietic* ini terjadi di sumsum tulang (*bone marrow*) dan dibantu oleh sel-sel stromal dengan cara memproduksi *hematopoietic* regulator seperti *sitokine* dan *neurotransmitter* (Murthy, 2008). Hematopoiesis yang akan memproduksi sel darah merah yaitu (*myeloid*) dan darah putih (*lymphoid*) berasal dari satu jenis sel induk atau *hematopoietic stem cell* (CD34+) (Mohan, 2010).

2.4 Organ Sistem Imun

Sistem imun secara struktural terbagi atas berbagai organ dan jaringan yang secara fungsional disatukan melalui sistem sirkulasi darah dan limfatik yang memfasilitasi lalu lintas resirkulasi limfosit. Organ limfoid primer merupakan organ dimana limfosit diproduksi. Organ limfoid primer adalah sumsum tulang dan timus (Allen, 2002).

Limfosit akan terdistribusi ke organ limfoid sekunder yaitu *lymph node* dan limpa. Organ limfoid sekunder tempat dimana limfosit berkumpul dan melakukan interaksi dengan antigen pada sisten *innate immunity* (Kerr, 1998). Limfosit T berasal dari sumsum tulang, namun hanya limfosit B yang mengalami pemasakan pada sumsum tulang (Allen, 2002).

Limfosit T melakukan migrasi dari sumsum tulang menuju organ timus sebelum masak dan mengalami pemasakan pada organ ini. Limfosit tersebut disebut limfosit B dan T, karena berturut-turut mengalami proses pemasakan pada *bone marrow* (sumsum tulang) dan timus. Limfosit yang telah mengalami pemasakan pada organ limfoid primer segera memasuki peredaran darah untuk menuju organ limfoid sekunder. Organ limfoid sekunder merupakan organ limfoid perifer tempat terjadinya penangkapan antigen oleh sel-sel imunokompeten. Pada organ limfoid perifer ini imunitas adaptif dimulai. Pada setiap saat tubuh kita selalu berhadapan dengan patogen yang masuk. Patogen memasuki tubuh kita dengan berbagai cara, misalnya dari makanan, minuman, udara dan luka. Antigen dan limfosit akhirnya akan bertemu pada organ limfoid perifer yaitu pada *lymph node*, *spleen* dan jaringan limfoid mukosa. Pada organ limfoid perifer inilah sebenarnya dimulainya imunitas adaptif. Pada organ limfoid perifer sel-sel tertentu yang dikenal dengan nama *antigen presenting cell* (APC) seperti makrofag, sel dendritik dan sel B akan mempresentasikan antigen dalam bentuk peptida. Peptida dipresentasikan pada permukaan APC dalam keadaan terikat oleh MHC. Limfosit mengenali antigen yang terikat oleh MHC (Allen, 2002).

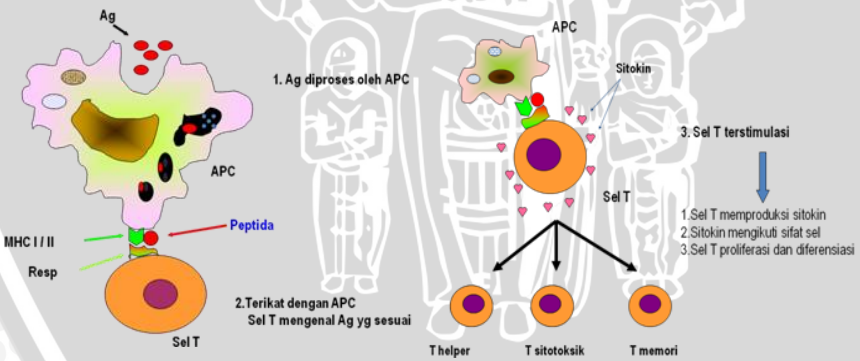
Baratawidjaya (2006), menjelaskan bahwa dewasa ini telah dikenal sekitar 247 molekul CD. Molekul yang sangat penting itu dapat digunakan untuk membedakan sel T (CD2 dan CD3), subset sel T (CD4, CD8) dan sel T yang diaktifkan (CD25), sel B (CD19, CD20), sel fagosit mononuklear (CD64, CD68), sel prekursor hematopoietik (CD34), sel B, sel T, monosit, sel NK (CD62L), semua sel hematopoietik (CD45/B220). CD4 merupakan antigen yang mengekspresikan sel pada subset timosit dan sel inflamasi sel T (sekitar 2/3 sel T perifer), monosit dan makrofag. CD4 berfungsi sebagai ko-reseptor MHC kelas-II (*Major Histocompatibility Complex*).

Mengikat Lck pada membran yang berhubungan dengan membran. Sedangkan CD8 adalah antigen yang mengekspresikan sel subset timosit, sel T sitotoksik. CD8 ini berperan sebagai ko-reseptor MHC kelas I dan mengikat Lck pada membran yang berhadapan dengan sitoplasma (Baratawidjaya, 2006). Menurut (Biosciences, 2000), dalam sumsum tulang dewasa pada sel induk hematopoietik terdapat penanda permukaan sel antara lain meliputi: CD90, TER-119, CD45R/B220, CD11b, Ly-6G, CD4-CD8, Sca-1, dimana untuk sebagai petanda sel induk hematopoietik multipoten, progenitor *committed* pada garis *myeloid* atau prekursor eritroid pada sel limfosit B dan T.

2.5 Imunitas Seluler

Imunitas seluler merupakan kondisi imunitas suatu organisme yang melibatkan peran sel-sel imun, seperti makrofag, sel limfosit B dan sel limfosit T. Pada imunitas seluler, peranan pokok dipegang oleh sel limfosit T. Imunitas seluler berperan penting dalam melawan infeksi virus, melawan infeksi bakteri intraseluler seperti *Salmonella thypii*, *Mycobacterium tuberculosis* dan *Legionella pneumophila* (Decker, 2000).

Mekanisme kerja imunitas seluler ditunjukkan pada gambar berikut ini:



Gambar 3. Skema mekanisme kerja imunitas seluler (Decker, 2000)

Berdasarkan (gambar 3) tersebut, dapat diketahui bahwa ketika terdapat antigen yang masuk ke dalam tubuh, maka antigen tersebut akan diproses oleh APC. Peptida antigen akan membentuk kompleks dengan MHC. Selanjutnya akan dikenali oleh reseptor sel T. Sel T akan terstimulasi untuk membentuk sitokin. Sitokin-sitokin tersebut akan menginduksi terjadi proliferasi sel limfosit T menjadi beberapa subpopulasi sel T, seperti sel T helper ($CD4^+$), sel T sitotoksik ($CD8^+$), dan sel T memori (Decker, 2000).

Sel T dibentuk dalam tubuh melalui suatu proses hematopoiesis. Hematopoiesis merupakan proses diferensiasi *hematopoietic stem cell* (HSC) menjadi sel-sel darah merah dan putih yang matang. Hematopoiesis pada orang dewasa terjadi pada sumsum tulang dan dibantu oleh sel-sel stromal dengan cara memproduksi *hematopoietic regulator* seperti sitokin dan *neurotransmitter* (Baratawidjaya, 2006). Proses hematopoiesis untuk memproduksi sel darah merah dan sel darah putih berasal dari satu jenis sel induk myeloid atau dari *hematopoietic stem cell* ($CD34^+$) (Baratawidjaya, 2006). Sel induk akan berkembang menjadi sel progenitor yang multipotensial. Sel multipotensial ini selanjutnya akan berkembang menjadi sel yang unipotensial, baik itu akan berkembang menjadi eritroid maupun limfoid, yang kemudian akan berkembang menjadi sel darah merah dan sel darah putih (Baratawidjaya, 2006).

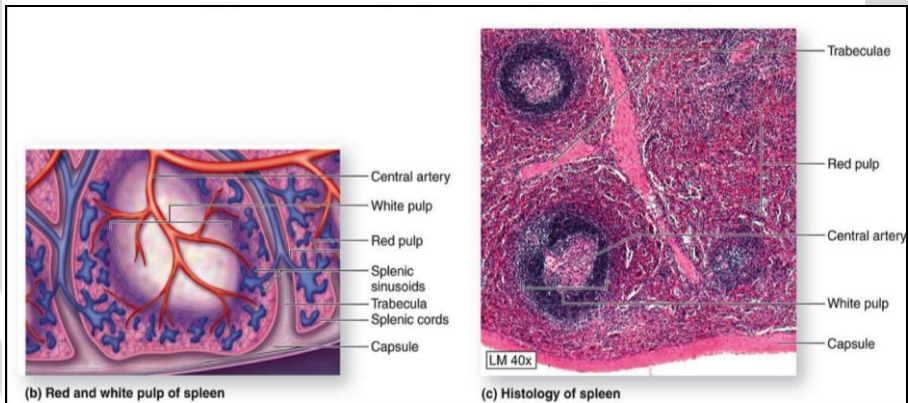
Pada perkembangan sel T, progenitor sel limfoid yang berkembang dari *hematopoietic stem cell* ($CD34^+$) akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel T $CD4^+$ dan sel T $CD8^+$ (Baratawidjaya, 2006). Sel T $CD4^+$ merupakan subpopulasi sel T yang mengekspresikan protein marker CD4. CD4 sendiri merupakan marker untuk sel T helper. Sedangkan subset populasi sel T yang mengekspresikan protein permukaan CD8, merupakan subset populasi sel T sitotoksik. Subpopulasi sel T bekerja saling terkait dalam membangun respon imun seluler suatu organisme (Baratawidjaya, 2006).

2.6 Organ *spleen*

Organ limfa (*spleen*) terletak di belakang lambung. Tugas organ ini yaitu mengumpulkan antigen dari darah, mengumpulkan dan menghancurkan darah merah yang telah kehilangan fungsi. Sebagian besar organ *spleen* terdiri dari daerah yang disebut pulpa merah, sebagai tempat darah merah yang telah tua dihancurkan (Mebius, 2005).

Terdapat daerah pada *spleen* yang disebut pulpa putih. Pulpa putih merupakan tempat berkumpulnya sel B yang berasal dari arteri di sekitarnya. Pada pulpa putih terdapat daerah tertentu tempat berkumpulnya sel T, yaitu *periarteriolar lymphoid sheath* (PALS). Sel dan antigen, lalu masuk ke dalam sinus dan menuju ke *vena trabekula*. *Sinus marginal* dikelilingi oleh zona marginal limfosit. Meskipun susunan *spleen* dan *lymph node* mempunyai persamaan, namun antigen yang masuk ke *spleen* lebih banyak berasal dari darah daripada dari cairan ekstraselluler (*lymph*). Organ *spleen* termasuk organ limfoid sekunder (Mebius, 2005).

Organ limfoid dapat dibagi menjadi dua bagian yaitu organ limfoid primer (*sentral*) dan organ limfoid sekunder (*periferal*). Sel-sel limfosit dihasilkan oleh organ limfoid primer yang nantinya akan bermigrasi menuju organ limfoid sekunder. Pada organ limfoid sekunder, sel-sel limfosit dijaga tetap hidup dan mengalami adaptasi akibat adanya antigen yang masuk ke dalam tubuh. Organ limfoid sekunder contohnya yaitu *spleen*, *lymph node*, *Peyer's patch*, *appendix*, *adenoid* dan tonsil (Mebius, 2005).

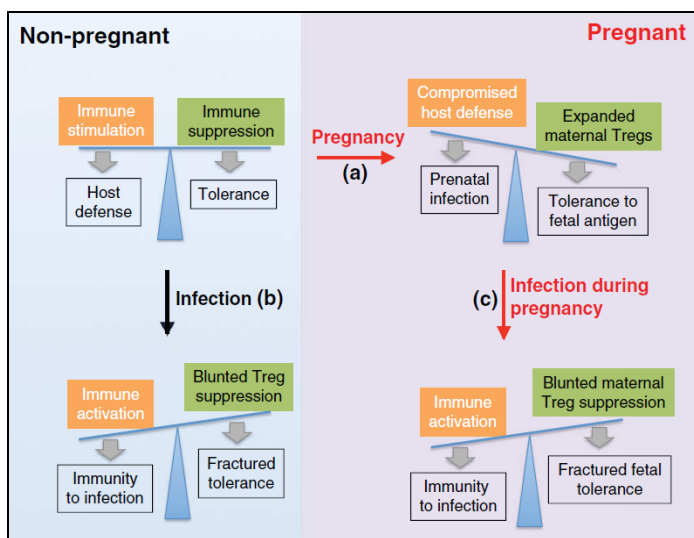


Gambar 4. Anatomi Organ *spleen* (VanPutte, 2010)

2.7 Kebuntingan Hubungannya dengan Sistem Imun

Toleransi dari sistem kekebalan tubuh maternal pada kebuntingan penting bagi keberhasilan kebuntingan. Selama kebuntingan, tubuh maternal mempertahankan ekspresi asing dari fetus (Rowe, 2013).

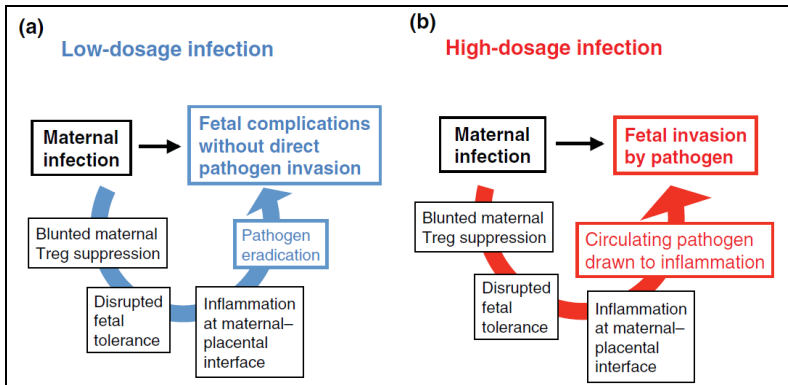
Hal ini karena pada tubuh fetus mengandung antigen dari paternal. Temuan epidemiologi menunjukkan bahwa, aborsi spontan dan preeklamsia berhubungan dengan aktivasi sistem kekebalan tubuh maternal. Sehingga toleransi imun maternal diperlukan untuk kelangsungan hidup fetus. Studi korelatif pada model hewan coba, menemukan beberapa mekanisme regulasi yang bekerja sama dalam membantu melindungi fetus terhadap kemungkinan penolakan dari sistem kekebalan tubuh maternal. Penekanan leukosit maternal, pada hubungan antara fetus dengan maternal dapat menyebabkan toleransi fetus. Hal ini karena, tidak adanya molekul MHC pada *trophoblast* fetus. Sehingga membatasi imunogenisitas semi-*allogeneic* fetus dan adanya molekul imunoregulatori pada *trophoblast* termasuk *Fas ligand* (FASL), CD274, *human leukocyte antigen-G* (HLA-G) (Rowe, 2013).



Gambar 5. Perubahan keseimbangan antara stimulasi sistem imun dan penekanan sistem imun selama kehamilan atau setelah infeksi (Rowe, 2013)

Selain itu, sel T regulator jumlahnya diperbanyak selama masa kebuntingan dan telah terbukti penting untuk mempertahankan kebuntingan. Limfosit maternal berinteraksi dengan antigen fetus dalam jaringan limfoid (Rowe, 2013).

Studi antara *B cell receptor* (BCR) dan *T cell receptor* (TCR) pada mencit transgenik, menunjukkan limfosit maternal sadar dan mengetahui terhadap antigen fetus. Interaksi antara antigen janin dan limfosit menghasilkan toleransi dalam jaringan limfoid. Ketika terjadi kebuntingan, tubuh maternal lebih rentan terhadap infeksi virus maupun bakteri intraseluler (Rowe, 2013).



Gambar 6. Skema bagaimana komplikasi dalam kehamilan dapat terjadi dengan atau tanpa adanya infeksi dari patogen ke dalam plasenta fetus (Rowe, 2013)

2.8 *Salmonella typhimurium*

Bakteri *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki morfologi batang lurus pendek dengan panjang (1 - 1,5) mikrometer. Tidak membentuk spora, Gram negatif dan ciri-ciri morfologi dan fisiologi sangat erat hubungannya dengan genus lain dalam famili *Enterobacteriaceae*. Biasanya bergerak motil dengan menggunakan *peritrichous flagella* dan kadang terjadi bentuk non-motil. Memproduksi asam dan gas dari glukosa, maltosa, mannitol, dan sorbitol, tetapi tidak memfermentasi laktosa, sukrosa, atau salicin; tidak membentuk indol, susu koagulat, atau gelatin cair (Damianus, 2008).

Bakteri *Salmonella typhimurium* memiliki klasifikasi sebagai berikut (Damianus, 2008):

Kingdom : Bakteria
Filum : Proteobakteria
Kelas : Gamma Proteobakteria
Ordo : Enterobakteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Salmonella*
Spesies : *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium merupakan bakteri *fakultatif intraseluler* yang patogen pada manusia dan hewan bila masuk melalui mulut. Bakteri *fakultatif intraseluler* dapat hidup dan berkembangbiak dalam berbagai macam sel, termasuk makrofag yang berperan penting dalam imunitas. Mekanisme imunitas seluler merupakan mekanisme yang paling tepat untuk melakukan eliminasi, dimana antibodi dalam sirkulasi darah tidak dapat menjangkau antigen-antigen yang berkembang di dalam sel (Abbas, 1994).

Patogenesis *Salmonella* terbagi dalam 3 tahap, yaitu (1) kolonisasi usus yang merupakan tahapan penting dalam patogenesis *Salmonellosis*. Faktor yang mempengaruhi kolonisasi usus adalah adanya penambahan keseimbangan flora normal usus yang menghambat proses kolonisasi dan faktor *peristaltik* (2) perusakan lapisan epitel usus (3) pengertakan pengeluaran cairan (Damianus, 2008).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Percobaan ini dilaksanakan pada bulan November 2013 sampai dengan bulan Juni 2014. Pelaksanaan penelitian bertempat di Animal Room Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Deskripsi Hewan Coba

Hewan yang digunakan untuk penelitian adalah mencit betina bunting (*Mus musculus*) galur BALB/c berumur 6 minggu dengan kondisi sehat, bergerak aktif, rambut tidak rontok, tidak memiliki kecacatan. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan yaitu kontrol non-bunting, mencit kontrol bunting diinfeksi *Salmonella typhimurium*, dosis I dan dosis II. Masing – masing perlakuan 3 kali ulangan dan dilakukan pembedahan 2 kali, sehingga jumlah mencit yang digunakan yaitu 24 ekor.

3.2.2 Perlakuan Hewan Coba

Penelitian ini diawali dengan dilakukan aklimasi selama 1 minggu. Kemudian, mencit betina dikelompokkan berdasarkan perlakuan seperti pada tabel berikut ini :

Tabel 3.1 Kelompok Perlakuan

Mencit BALB/c betina	Kontrol (non bunting tanpa perlakuan oral dan tidak diinfeksi)
	Kontrol (bunting diinfeksi <i>Salmonella typhimurium</i> , tanpa perlakuan oral ekstrak campuran daun <i>E. scaber</i> dan <i>P. obtusa</i>)
	Dosis I (bunting diberi perlakuan oral ekstrak campuran daun <i>E. scaber</i> 50 mg/g BB dan <i>P. Obtusa</i> 0 mg/g BB dan diinfeksi <i>S. typhimurium</i>)
	Dosis II (bunting diberi perlakuan oral ekstrak campuran daun <i>E. Scaber</i> 25 mg/g BB dan <i>P. obtusa</i> 25 mg/g BB dan diinfeksi <i>S. typhimurium</i>)

Setelah dilakukan pengelompokkan mencit betina, kemudian dipilih mencit yang kondisi morfologi vaginanya merah dan terbuka bagian vulva (indikasi estrus) untuk dilakukan *smear* vagina. Awalnya dibersihkan objek *glass* dengan alkohol 75%, diambil *cotton bud* yang kemudian dicelupkan ke dalam akuades. Mencit betina *dismear* pada bagian liang vagina menggunakan *cotton bud*. Hasil *smear* dioles pada objek *glass*, lalu dicelupkan dalam alkohol 75% selama 5 menit untuk memfiksasi sel. Kemudian, dikeringkan dan diamati dengan mikroskop binokuler perbesaran (400X). Dilakukan pengamatan, apabila sel terkornifikasi, tidak mempunyai inti maka mencit tersebut estrus. Sehingga, pada sore hari mencit betina estrus dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan 1:1. Pada pagi hari sebelum pukul 06.00 pagi, dilihat adanya vaginal *plug*, jika ada maka dianggap bunting hari ke-0.

Mencit mulai diberi perlakuan oral ekstrak campuran daun *E. Scaber* dan *P.obtusa* pada hari kebuntingan ke-0 hingga hari ke-7, dilakukan infeksi menggunakan *Salmonella typhimurium* dengan injeksi secara intraperitoneal, namun tetap diberi perlakuan oral ekstrak tersebut hingga pembedahan pertama yaitu hari kebuntingan ke-14 dan pembedahan kedua hari kebuntingan ke-18. Prosedur pembuatan isolat bakteri *Salmonella typhimurium*, pembuatan ekstrak Ethanol Tapak Liman (*E.scaber*) dengan Kedondong Laut (*P.obtusa*) akan dijelaskan lebih lanjut pada bagian selanjutnya.

3.2.3 Pembuatan Ekstrak Ethanol Tapak Liman (*E. scaber*) dan Kedondong Laut (*P. obtusa*)

Proses awal, disiapkan simplisia daun *P.obtusa* 500 g dan simplisia daun *E.scaber* 500 g. Simplisia daun *P.obtusa* sebanyak 500 g direndam dengan 2, 5 liter alkohol 96% selama 24 jam. Hasil rendaman diberi 2,5 liter alkohol 96% dan dibiarkan selama 24 jam. Kemudian, hasil rendaman ditekan dengan alat *press* hidrolis. Dilakukan proses ekstraksi dengan cara diuapkan alkoholnya sampai diperoleh pasta. Sehingga didapatkan pasta daun *P. obtusa* yang siap untuk digunakan. Proses pembuatan pasta daun *E.scaber* juga sama prinsip kerjanya dengan pembuatan pasta daun *E.scaber*. Setelah diperoleh pasta daun Tapak Liman dan pasta daun Kedondong Laut, kemudian dilarutkan dengan akuades untuk membuat larutan stok.

Diambil 500 mg ekstrak Tapak Liman (berbentuk pasta) diberi akuades yang masih dalam keadaan hangat, diaduk hingga tercampur, dimasukkan dalam botol dan dilabel stok 100% TL (dosis I). Pembuatan stok dosis I juga sama dengan pembuatan stok 0% TL : 100% PO.

3.2.4 Uji Konfirmasi Isolat Bakteri *Salmonella typhimurium*

Sebelum menggunakan isolat bakteri *S. Typhimurium*, maka perlu dilakukan uji konfirmasi dalam rangka untuk memastikan bahwa isolat yang digunakan adalah benar bakteri *Salmonella typhimurium*. Berikut ini merupakan uraian cara melakukan uji konfirmasi.

3.2.4.1 Uji Media BSA

Media BSA dibuat dengan 40 g BSA yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades, kemudian media ditunggu hingga memadat. Sebelum diuji, terlebih dahulu dilakukan peremajaan bakteri *Salmonella typhimurium* pada media NA yang diinkubasi 24 jam suhu 37°C. Koloni yang terbentuk, diinokulasikan pada media BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) dan diinkubasi 24 jam suhu 37 °C. Selanjutnya, diamati hasil positif yaitu dengan terbentuknya koloni berwarna hitam dan diambil untuk dilanjutkan pada uji selanjutnya.

3.2.4.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan cara diambil 1 ose isolat bakteri murni hasil peremajaan 24 – 48 jam. Diletakkan pada gelas objek yang telah ditetesi dengan Hidrogen Peroksida (H₂O₂) 3% sebanyak satu tetes. Uji positif ditunjukkan, ketika terdapat gelembung gas pada hasil akhir.

3.2.4.3 Uji Pewarnaan Cat Gram

Uji pewarnaan cat gram dilakukan dengan cara diambil 1 ose koloni hitam yang terbentuk pada BSA yang menandakan koloni positif di atas gelas objek steril hingga berbentuk apusan. Gelas objek difiksasi di atas api dan ditetesi cat gram A (*Hucker's crystal violet*) selama 1 menit dan dicuci air mengalir. Kemudian, ditetesi cat gram B (*Lugol's iodine*) selama 1 menit dan dicuci air mengalir. Ditetesi cat gram C (alkohol) selama 30 detik dan dicuci air mengalir. Tahap akhir, ditetesi cat gram D (safranin) selama 1 menit dan dicuci air mengalir.

Kemudian, dibiarkan hingga kering dan diamati morfologinya dengan mikroskop. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan warna merah yang menandakan bahwa bakteri *S.typhimurium* bersifat gram negatif.

3.2.4.4 Uji KIA dan LIA

Media KIA dibuat dengan 0, 99 g bubuk media KIA yang dilarutkan dalam 18 ml akuades. Media LIA dibuat dengan 0, 612 g bubuk media LIA dan dilarutkan dalam 18 ml akuades. Selanjutnya, media disterilisasi dan dibuat agar *slant* pada tabung reaksi. Uji KIA dan LIA dilakukan dengan menggunakan koloni positif yang berwarna hitam pada BSA. Koloni tersebut diambil dengan jarum enten dan ditusukkan pada KIA dan LIA *slant*. Kemudian ditarik garis hingga terbentuk belahan pada *slant*. Media KIA dan LIA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam dan diamati perubahannya. Uji KIA dan LIA akan mereaksikan keberadaan gula laktosa dan dextrose pada media, serta melihat kemampuan membentuk H₂S yang akan diikat sebagai *ferri sulfida* yang terlihat berwarna hitam pada media dan berarti uji menghasilkan hasil positif.

3.2.4.5 Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Salmonella typhimurium* dibuat dengan menggunakan kultur bakteri yang diambil 1 ose, kemudian ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* (NB) 15 ml dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. Kemudian, diambil 15 ml kultur bakteri dan dicampur dengan 135 ml media NB. Dilakukan sampling setiap 1 jam, dengan mengambil 3 ml dan ditambah 1 ml formalin. Masing-masing suspensi per satu jam tersebut dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan dihitung jumlah selnya dengan *Haemocytometer*.

3.2.4.6 Kurva Standar

Kurva standar dilakukan dengan mengkultur koloni bakteri *S.typhimurium* pada media *Nutrient Broth*. Suspensi isolat pada media NB dengan perbandingan konsentrasi berbeda (pengenceran) kemudian dihomogenasi. Berikut ini merupakan perbandingan antara media steril dan kultur yang dibuat.

Tabel 3.2 Perbandingan Stok Bakteri *S. Typhimurium* dengan Media Steril

Perbandingan	Stok kultur (ml)	Media steril (ml)
0 : 8	0 ml	4 ml
1 : 7	0, 5 ml	3, 5 ml
2 : 6	1 ml	3 ml
3 : 5	1, 5 ml	2, 5 ml
4 : 4	2 ml	2 ml
5 : 3	2, 5 ml	1, 5 ml
6 : 2	3 ml	1 ml
7 : 1	3, 5 ml	0, 5 ml
8 : 0	4 ml	0

Berdasarkan perbandingan tersebut, masing-masing suspensi dihitung absorbansinya (*Optical Density*) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan dihitung jumlahnya dengan *Haemocytometer*.

3.2.4.7 Uji Patogenitas

Uji patogenitas dilakukan dengan diambil 1 ose dari isolat bakteri murni hasil peremajaan 24 - 48 jam, lalu *distreak plate* pada media *Blood agar* diinkubasi suhu 37°C selama 24 – 48 jam. Hasil uji akan menunjukkan hasil positif, apabila media berubah warna menjadi bening secara menyeluruh disekitar koloni. Hal ini terjadi karena adanya aktivitas enzim *hemolysin* dari bakteri. Enzim ini dapat mendegradasi eritrosit sel darah merah sehingga bersifat patogen bagi tubuh, khususnya darah.

3.2.5 Pembuatan Isolat *S.typhimurium* untuk Injeksi

Setelah dilakukan uji konfirmasi, menunjukkan hasil positif yang berarti isolat yang digunakan benar bakteri *S.typhimurium* yang bersifat patogen. Selanjutnya, disiapkan 10 ml media steril *Nutrient Broth*. Diambil 1 ose pada *NA slant* yang berisi *S.typhimurium* dan dimasukkan dalam 10 ml NB diinkubasi 37°C selama 24 jam dalam inkubator. Sehingga nantinya diperoleh inokulum aktif untuk dibuat injeksi. Diambil 0, 5 ml inokulum aktif dicampur dengan 4, 5 ml NB steril.

Pada jam ke-0 langsung diinjeksi ke mencit secara *intraperitoneal* sebanyak 0, 5 ml per mencit. Injeksi dilakukan setelah hari ke-7 kebuntingan.

3.2.6 Isolasi Sel Limfosit dari Organ *Spleen*

Mencit yang telah diberi perlakuan kemudian dilakukan pembedahan. Mencit ditaruh pada papan *sectio* yang telah disemprot alkohol terlebih dahulu. Mencit didislokasi leher untuk membunuh mencit tanpa merusak organ dalamnya dan dilakukan pembedahan pada bagian *peritonal*. Diisolasi organ berupa *spleen*, yang kemudian dicuci dengan PBS steril 2-3 kali. Organ *spleen* dimasukkan dalam cawan Petri berbeda yang berisi PBS. Dipencet menggunakan pangkal spuit dengan arah pemencetan searah jarum jam ditekan dari atas ke bawah hingga halus, kemudian disaring dengan *wire* dan dimasukkan dalam tabung propilen 15 ml. Diberi PBS \pm 5 ml pada hasil saringan sel. Suspensi yang diperoleh disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm, suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan yang dibuang, pelet diresuspensi dengan PBS sebanyak 1 ml dan dihomogenasi dalam *eppendorf*. Diambil 70 μ l sel dan ditambah 500 μ l PBS dimasukkan dalam microtube. Dilakukan sentrifugasi kembali pada 1500 rpm, suhu 10°C selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambah antibodi 50 μ l dan diinkubasi selama 15 menit dalam kondisi gelap di dalam *ice box*.

3.2.7 Analisis Kuantitatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ Menggunakan *Flowcytometry*

Pelet hasil dari isolasi *spleen* dalam *eppendorf* ditambahkan antibodi monoklonal yaitu *phycoerythrin* (PE)-*conjugated anti-mouse* CD8 dan *fluorescein isothiocyanate* (FITC)-*conjugated anti-mouse* CD4, lalu disimpan di dalam *ice box* dan diinkubasi dalam kondisi gelap. Kemudian dilakukan koneksi antara komputer dengan *flowcytometry* pada keadaan “*acquiring*” dan setting *software BD Cell Quest Pro*TM sesuai kebutuhan meliputi setting instrument, banyaknya sel yang akan dianalisis, label antibodi yang digunakan, kekuatan eksitasi laser, nama sampel, dan penentuan *gated area* limfosit pada plot histogram. Dilakukan setting plot pada *acquiring mode*, label CD4⁺ pada sumbu X dan CD8⁺ pada sumbu Y, lalu dilakukan *gating area* (G1=R1). *Flowcytometry* dipastikan dalam keadaan *Low-Run*.

Setelah instrument siap, pelet yang sudah diberi antibodi dimasukkan tabung kuvet pada *flowcytometry* dengan mikropipet, lalu ditambahkan 500 μ l PBS dan dihomogenkan dengan cara pipetting. Kuvet dipasang pada *nozzle BD Biosciences FACSCalibur™ flowcytometry*.

3.2.8 Analisis Data

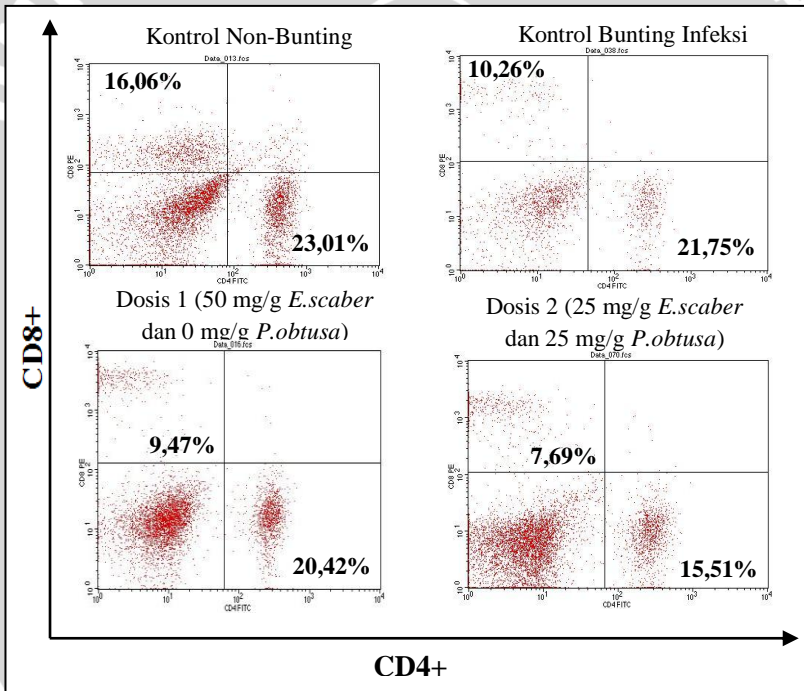
Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan uji ANOVA selang kepercayaan 95%, data jumlah relatif sel T CD4⁺, CD8⁺, pada organ *spleen* diuji statistik dengan uji normalitas, uji homogenitas varian. Data yang telah terdistribusi normal dengan variasi homogen, diuji dengan *one-way* ANOVA dengan nilai $\alpha=0.05$. apabila diperoleh $p>0.05$ maka tidak ada beda nyata antar perlakuan, sebaliknya jika $p<0.05$ maka ada beda nyata antar perlakuan. Kemudian dilakukan *post-hoc test* dengan uji *Tukey HSD (High Significant Difference)*. Data diuji statistik menggunakan program SPSS 16.0 for Windows.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

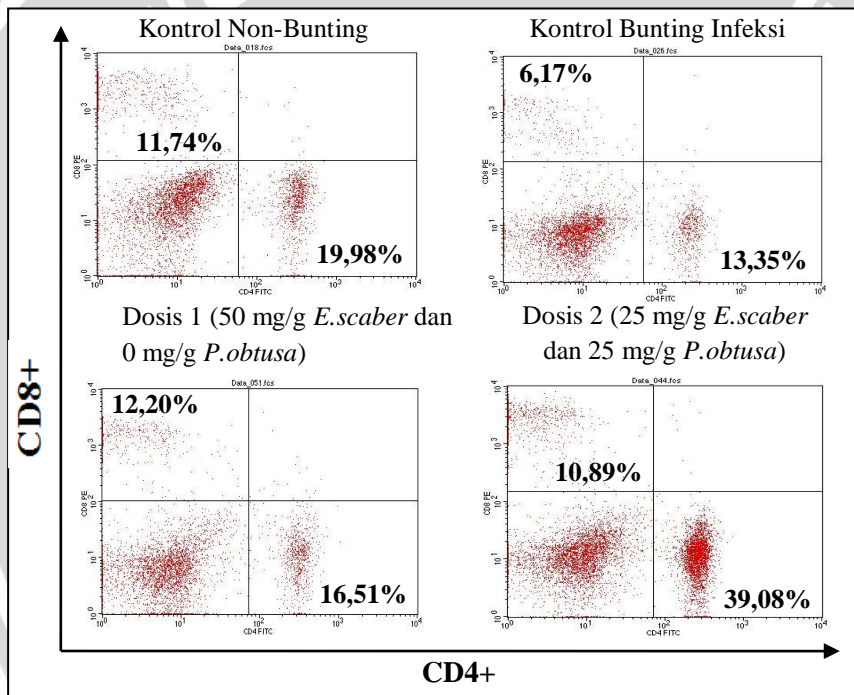
4.1 Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺

Analisis jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh aktifitas biologis dari pemberian ekstrak ethanol daun *E. Scaber* dan *P. obtusa* terhadap peningkatan kuantitas sel CD4⁺ dan CD8⁺. Peningkatan kuantitas sel CD4⁺ dan CD8⁺ dapat digunakan untuk melihat karakter sistem imun yang dianalisis menggunakan *Flowcytometry*. Sel CD4⁺ dan CD8⁺ berhubungan dengan respon imun seluler, dimana sel CD4⁺ sebagai sel T *helper* dan sel CD8⁺ sebagai sel T sitotoksik.



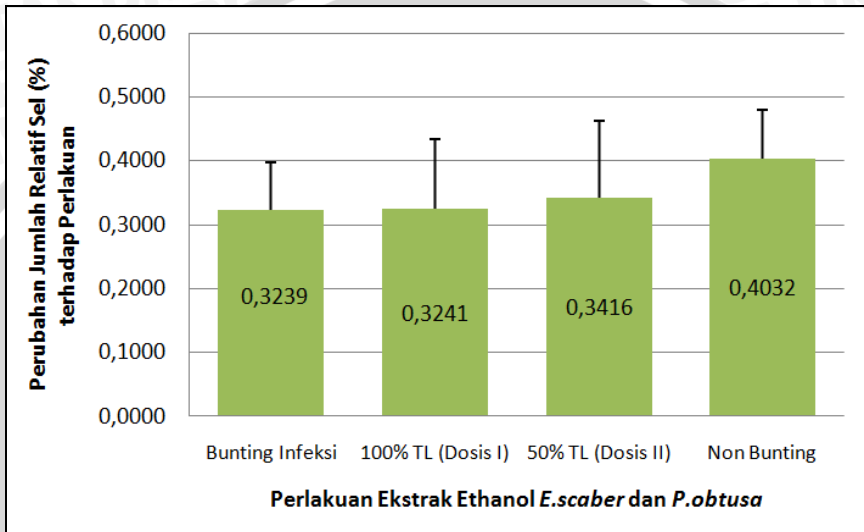
Gambar 7. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dari hasil analisis *Flowcytometry* pada organ *spleen* pembedahan hari ke-14

Hasil (gambar 4) di atas menunjukkan, jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pembedahan hari ke-14 pada perlakuan kontrol lebih tinggi dibanding dengan perlakuan dosis I dan dosis II. Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pembedahan hari ke-14 mengalami peningkatan jumlah relatif sel pada perlakuan dosis I dibanding dengan perlakuan dosis II. Hal ini berbeda dengan hasil pada gambar 5. Jumlah relatif sel T CD4⁺ pembedahan hari ke-18, pada perlakuan dosis II mengalami peningkatan dibanding dengan dosis I dan perlakuan kontrol. Sedangkan jumlah relatif sel T CD8⁺ pembedahan hari ke-18, pada perlakuan dosis I mengalami peningkatan dibanding dengan dosis II dan perlakuan kontrol.



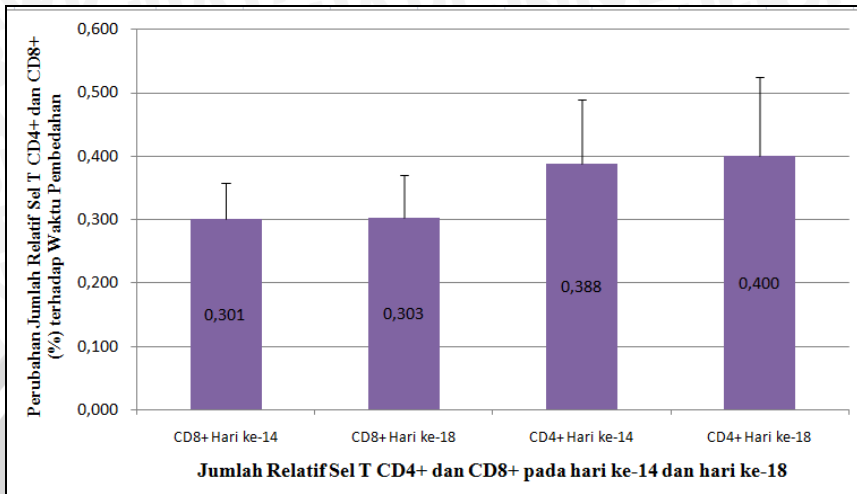
Gambar 8. Profil persentase jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dari hasil analisis *Flowcytometry* pada organ *spleen* pembedahan hari ke-18

Data hasil *Flowcytometry*, kemudian dianalisis statistika (Gambar 6) menunjukkan jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ tidak berbeda nyata dengan perlakuan yang digunakan.



Gambar 9. Perubahan Jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap perlakuan pada organ *spleen*. Keterangan : Kontrol = Non-Bunting; Kontrol = Bunting Infeksi; Dosis 1= 50 mg/g *E.scaber* dan 0 mg/g *P.obtusa*; Dosis 2= 25 mg/g *E.scaber* dan 25 mg/g *P.obtusa*

Hasil uji statistik (gambar 7) menunjukkan bahwa jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ tidak berbeda nyata dengan waktu pembedahan hari ke-14 dan hari ke-18.



Gambar 10. Perubahan Jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap waktu pembedahan hari ke-14 dan hari ke-18 pada organ *spleen*

Berdasarkan hasil, terlihat *p-value* Perlakuan sebesar 0,165 ($>0,05$) pada lampiran 3 tabel 3. Hal ini berarti rata-rata jumlah relatif sel T tidak berbeda secara nyata untuk perlakuan yang diberikan pada mencit bunting BALB/c. Berdasarkan hasil output *Tukey Test* dan subset yang terbentuk terlihat bahwa jumlah relatif sel T tidak berbeda nyata untuk perlakuan yang diberikan pada mencit bunting BALB/c. Kemudian, terlihat bahwa *p-value* waktu pembedahan sebesar 0,013 ($<0,05$) pada lampiran 3 tabel 5. Hal ini berarti rata-rata jumlah relatif sel T memang berbeda secara nyata untuk tiap waktu pembedahan. Berdasarkan hasil output *Tukey Test* dan subset yang terbentuk terlihat bahwa jumlah relatif sel T tidak berbeda nyata terhadap waktu pembedahan.

Terdapat kemungkinan, senyawa yang terkandung dalam ekstrak ethanol daun *E.scaber* dan *P.obtusa* mampu berperan sebagai imunostimulan, sehingga dapat meningkatkan proliferasi dan deferensiasi sel T *naive* menjadi subset sel T CD4⁺. Peningkatan maupun penurunan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ kemungkinan akibat dari aktifitas biologis senyawa *panaxidol* yang terkandung dalam *P.obtusa* dan senyawa *stigmasterol* yang terkandung dalam *E.scaber*.

Senyawa tersebut mampu berperan sebagai imunostimulan dan immunosupresan. Senyawa tersebut mampu menjadi immunosupresan sel T naive $CD4^+ CD8^+$ yang menghambat proliferasi maupun diferensiasi sel T naive menjadi subset sel T $CD8^+$ yang spesifik sebagai sel Tc. Sel Tc ini berperan dalam mengeliminasi antigen yang menginfeksi tubuh. Menurut (Rifa'i, 2008), terjadi stimulasi proliferasi dan diferensiasi sel T naive $CD4^+ CD8^+$ menjadi spesifik sel T $CD4^+$ sebagai sel T efektor Th1 maupun Th2. Terjadinya diferensiasi sel T $CD4^+$ menjadi Th1 dan Th2 tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon mikroba yang memacu reaksi imunitas (Rifa'i, 2010).

Mikroba yang dapat memacu produksi IL-12 secara tidak langsung, misalnya virus, beberapa parasit memacu sel NK untuk memproduksi *IFN-gamma* dan memacu makrofag mengeluarkan IL-12. IL-12 berikatan dengan sel T $CD4^+$ sehingga memacu untuk menjadi sel Th1. IL-12 juga meningkatkan produksi *IFN-gamma* dan aktifitas sitolitik yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dan sel NK sehingga memacu imunitas seluler. *IFN-gamma* yang diproduksi Th1 akan menghambat proliferasi sel Th2 sehingga meningkatkan dominasi sel Th1 (Kung, 2000).

Kemungkinan selanjutnya senyawa yang terkandung di dalam ekstrak ethanol daun *E.scaber* dan *P.obtusa* berperan sebagai imunostimulan yang mampu meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel T naive menjadi subset sel T $CD4^+$. Pada permulaannya, progenitor sel T dalam timus tidak mengekspresikan CD8 dan CD4. Proses perkembangannya juga melalui beberapa tahapan. Timosit yang belum matang mengekspresikan CD8 dan CD4 dan sel ini akan meningkatkan kematangan sel T yaitu $CD4^+, CD8^-$ atau $CD4^-, CD8^+$. Sel T yang mampu mengenal pasti MHC ini akan dipilih untuk proses pematangan yang dikenali sebagai seleksi positif. MHC kelas I ini akan mengeluarkan sinyal instruksi untuk mengarahkan diferensiasi kepada jalur CD8 (Michael, 2006).

Sel T $CD8^+$ naif memerlukan aktivasi dan diferensiasi lanjut untuk menjadi sel T efektor yang bisa melisis sel target yang terinfeksi antigen dan sel-sel tumor (Rifa'i M, 2013). Sel T $CD8^+$ mengenali antigen yang dipaparkan oleh molekul MHC I. Oleh karena, molekul MHC I dapat ditemukan pada sel-sel tubuh yang memiliki nukleus, maka sel T $CD8^+$ dengan mudah memonitor sel jika terjadi tanda-tanda infeksi (Michael, 2006).

Sel T CD8⁺ akan diaktifasi menjadi sel T efektor setelah bertemu langsung dengan antigen pada APC *professional* atau *non-profesional* dan menerima “*second signal*”, sehingga sitokin seperti IL-2, *IFN-gamma* dan *TNF-alpha* yang dilepaskan oleh sel T helper CD4⁺ (Rifa’i, 2004).

Pemberian perlakuan dosis untuk mengetahui jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ masih belum bisa ditentukan, berapa dosis optimum untuk meningkatkan ekspresi sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Peranan sel T CD8⁺ sebagai sel T sitotoksik, seharusnya mengalami peningkatan apabila tubuh terpapar antigen, bisa juga akibat adanya sel yang dimungkinkan sel kanker. Berdasar hasil, dimungkinkan adanya senyawa aktif *panaxidol* dalam *P.obtusa* mampu menstimulasi proliferasi sel T CD4⁺ dan CD8⁺, namun ketika ekstrak tersebut dicampur mampu menjadi immunosupresan, sehingga hasilnya tidak ada beda nyata resultantnya.



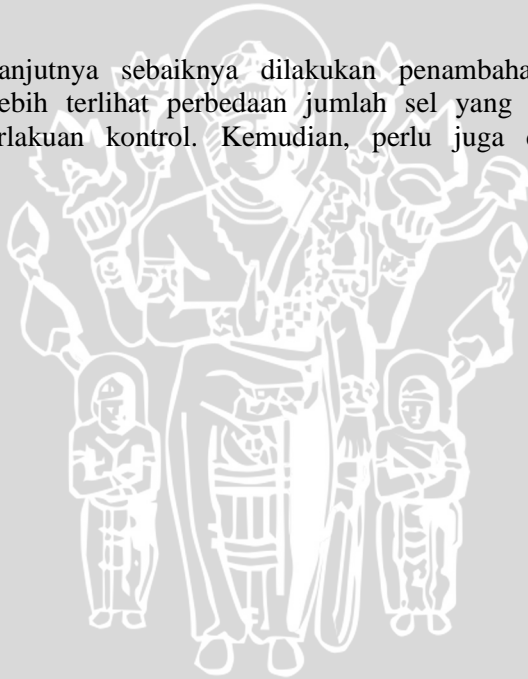
BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Pemberian ekstrak etanol daun *E.scaber* dan *P.obtusa* secara oral meningkatkan jumlah sel T CD4⁺ pada Dosis I (50 mg/g *E.scaber* dan 0 mg/g *P.obtusa*) pembedahan hari ke-14 dan Dosis II (25 mg/g *E.scaber* dan 25 mg/g *P.obtusa*) pada pembedahan hari ke-18 dan tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan jumlah sel T CD8⁺, pada Dosis 1 (50 mg/g *E.scaber* dan 0 mg/g *P.obtusa*). Dosis optimum ekstrak etanol daun *E.scaber* dan *P.obtusa* dalam peningkatan sel limfosit belum dapat ditentukan.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan penambahan waktu perlakuan agar lebih terlihat perbedaan jumlah sel yang dianalisis dibandingkan perlakuan kontrol. Kemudian, perlu juga dilakukan formulasi dosis.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., dan Lichtman, A.H. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. W.B. Saunders Company. California.
- Allen, S.E. 2002. The Liver : Anatomy, Physiology, Disease and Treatment. Northeastern University.
- Baratawidjaya, K.G. 2000. Imunologi Dasar. Balai Penerbit. FK UI: Jakarta.
- Biosciences. 2000. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Dickinson and Company. San Jose.
- Compleat Botanica. 2004. *Polyscias obtusa*. (Online), (<http://www.plant-supplies.com/plants/polysciasobtusa.htm>, diakses tanggal 13 Maret 2013).
- Damianus L., Sambada E. 2008. *Salmonella typhimurium*, Sang jawara penginfeksi dari Genus *Salmonella*. Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Daisy P, Priya C,E. 2010. Hypolipidemic and renal functionality potentials of the hexane extract fractions of *Elephantopus scaber* Linn. Int J Biomed Sci. 6(3), 241-245.
- Decker J.M. 2000. Introduction to immunology 11 th Hour. *Blackwell Science. Inc.* p. 1-2.
- Delves, P.J., Roitt, I.M., Martin, S.J., dan Burton D. 2006. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Publishing Inc. Massachusetts.
- Elfahmi. 2006. Phytochemical and Bio-synthetic Studies of Lignans with a Focus on Indonesian Medicinal Plants. Facilitas Beddrif of Gro-ningen The Netherlands. Thesis.
- Farsely M, Djati, MS., Rifa'i M. 2013. Effectivity of *Polyscias obtusa* Simplicia as Immunomodulator on Caeca Tonsil of Broiler Post Infection of *Salmonella typhimurium*. J.Exp.Life Sci. 3:1, (2087-2852).
- Istiyawati, A., Soetarno S., dan kusmardiyani S. 1994. Telaah Fitokimia Daun Kedondong Laut (*Polyscias rumphiana* Harms., Araliaceae).

- Kung, C., Pingel J., Heikinheimo M., Klemola T. 2000. Mutations in The Tyrosine phosphatase CD45 Genes in Child With Sever Combine Immunodeficiency Disease. *Nature Medicine*. 6(3): 343-5.
- Kurnianigtyas E., Djati, MS., Rifa'i M. 2013. Aktivitas Imunomodulator *Polyscias obtusa* Terhadap Sistem Imunitas Pada Bone Marrow Broiler Setelah Pemberian *Salmonella typhimurium*. *J.Exp.Life Sci*. 3:1, (2338-1655).
- Mebius, E R., dan Kraal G. 2005. Structure and Function of The Spleen. *Reviews Journal of Immunology*. Nature Publishing Group. (5)
- Michael, H.R. 2006. *Histology A Text and Atlas 5 th Edition*. Lippincott William & Wilkins. Maryland.
- Mohan V.R., Chenthurpandy P., dan Kalidass C. 2010. Pharmacognostic and phytochemical investigation of *Elephantopus scaber* L. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2 (3), 191-197.
- Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 200 (9), 1123-1134.
- Rifa'i M, Shi Z, Zhang SY, Lee YH, Shiku H, Isobe K, Suzuki H. 2008. CD8⁺CD12⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- α TCR interaction and become IL-10 producing active regulatory cells. *International immunology* 20 (7), 937-947
- Rifa'i M. 2010. Andrographolide ameliorate rheumatoid arthritis by promoting the development of regulatory T cells. *Journal of Tropical Life Science* 1 (1), pp.5-8.
- Rifa'i M. 2013. CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Preventing Detrimental Autoimmune Reactions. *The Open Autoimmunity Journal* 5: 1-5.
- Murphy K, Travers P, Walport M. 2008. *Immunobiology 7 th Edition*. Garland Science. New York.
- Pinca S, Djati, MS., Rifa'i M. 2013. Analisis Mobilisasi Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada Timus Ayam Pedaging Pasca Infeksi *Salmonella typhimurium* dan Pemberian Simplisia *Polyscias obtusa*.

- Rowe H J., Ertelt J M, Xin L., dan Way S S. 2013. Regulatory T cells and the immune pathogenesis of prenatal infection. *Review Journal of Reproduction*. 146 (R191-R203).
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 73: 601-610.
- Spelman, K., Burns J.J., Nichols D., Winters N., Ottersberg S., dan Tenborg M. 2006. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: A review of herbal immunomodulators. *Alternative Med. Rev.* 11: 128 – 146.
- Steenis, van.C.G.G.J. 2005. Flora. PT. Pradnya Paramita. Jakarta.
- U.S.Department of Health and Human Services. 2012. Drug Interaction Studies : Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. Clinical Pharmacology. Center for Drug Evaluation and Research.
- VanPutte C, Regan J, Russo A. 2010. Seeley's Anatomy and Physiology Edisi sembilan. McGraw-Hill. New York.
- Widianto, M. B. 1987. Imunomodulator. *Cermin Dunia Kedokteran* No. 44. Diakses tanggal 15 November 2013.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Normalitas Data

Tabel 1. Hasil uji Normalitas data jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		Sel relatif
N		48
Normal Parameters ^a	Mean	.3482
	Std. Deviation	.10016
Most Extreme Differences	Absolute	.108
	Positive	.108
	Negative	-.058
Kolmogorov-Smirnov Z		.750
Asymp. Sig. (2-tailed)		.627

a. Test distribution is Normal.

Lampiran 2. Uji Homogenitas

Tabel 2. Hasil uji Homogenitas data jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+

Test of Homogeneity of Variances			
Sel relatif			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.882	3	44	.458

Lampiran 3. Hasil Analisis Statistika Jumlah Relatif Sel T CD4+ dan CD8+ Melalui Software SPSS 16 for Windows

Tabel 3. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap Perlakuan

ANOVA					
Sel relatif					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.051	3	.017	1.778	.165
Within Groups	.421	44	.010		
Total	.472	47			

Tabel 4. Hasil uji *Tukey* jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap Perlakuan

Multiple Comparisons						
Sel relatif Tukey HSD						
(I) PA	(J) PA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Non_Bunting	Bunting_Infeksi	.07937	.03991	.208	-.0272	.1859
	100%_TL	.07918	.03991	.210	-.0274	.1857
	50%_TL	.06167	.03991	.420	-.0449	.1682
Bunting_Infeksi	Non_Bunting	-.07937	.03991	.208	-.1859	.0272
	100%_TL	-.00019	.03991	1.000	-.1068	.1064
	50%_TL	-.01770	.03991	.971	-.1243	.0889
100%_TL	Non_Bunting	-.07918	.03991	.210	-.1857	.0274
	Bunting_Infeksi	.00019	.03991	1.000	-.1064	.1068
	50%_TL	-.01751	.03991	.971	-.1241	.0891
50%_TL	Non_Bunting	-.06167	.03991	.420	-.1682	.0449
	Bunting_Infeksi	.01770	.03991	.971	-.0889	.1243
	100%_TL	.01751	.03991	.971	-.0891	.1241

Sel relatif		
Tukey HSD		
PA	N	Subset for alpha = 0.05
Bunting_Infeksi	12	1 .3239
100%_TL	12	1 .3241
50%_TL	12	1 .3416
Non_Bunting	12	1 .4032
Sig.		.208

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Tabel 5. Hasil uji ANOVA jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap waktu pembedahan

ANOVA					
Sel relatif					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.102	3	.034	4.051	.013
Within Groups	.369	44	.008		
Total	.472	47			

Tabel 6. Hasil uji *Tukey* jumlah relatif sel T CD4+ dan CD8+ terhadap waktu pembedahan

Multiple Comparisons						
Sel relatif Tukey HSD						
(i) PR	(j) PR	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CD4_14_Hari	CD8_14_Hari	-.08687	.03741	.108	-.0130	.1868
	CD4_18_Hari	-.01201	.03741	.988	-.1119	.0879
	CD8_18_Hari	-.08476	.03741	.122	-.0151	.1846
CD8_14_Hari	CD4_14_Hari	-.08687	.03741	.108	-.1868	.0130
	CD4_18_Hari	-.09888	.03741	.053	-.1988	.0010
	CD8_18_Hari	-.00211	.03741	1.000	-.1020	.0978
CD4_18_Hari	CD4_14_Hari	.01201	.03741	.988	-.0879	.1119
	CD8_14_Hari	.09888	.03741	.053	-.0010	.1988
	CD8_18_Hari	.09677	.03741	.061	-.0031	.1967
CD8_18_Hari	CD4_14_Hari	-.08476	.03741	.122	-.1846	.0151
	CD8_14_Hari	.00211	.03741	1.000	-.0978	.1020
	CD4_18_Hari	-.09677	.03741	.061	-.1967	.0031

Sel relatif		
Tukey HSD		
PR	N	Subset for alpha = 0.05
		1
CD8_14_Hari	12	.3012
CD8_18_Hari	12	.3033
CD4_14_Hari	12	.3881
CD4_18_Hari	12	.4001
Sig.		.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 4. *Vaginal Plug* pada Mencit Betina



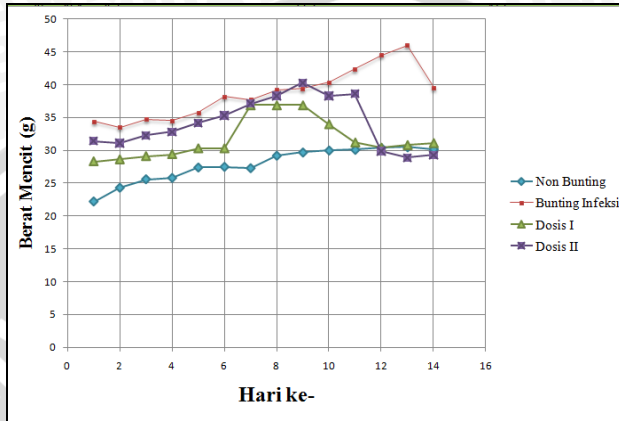
Gambar 11. Morfologi *Vaginal Plug* pada Mencit

Lampiran 5. Pembedahan Mencit Hari Kebuntingan ke- 18 Hari

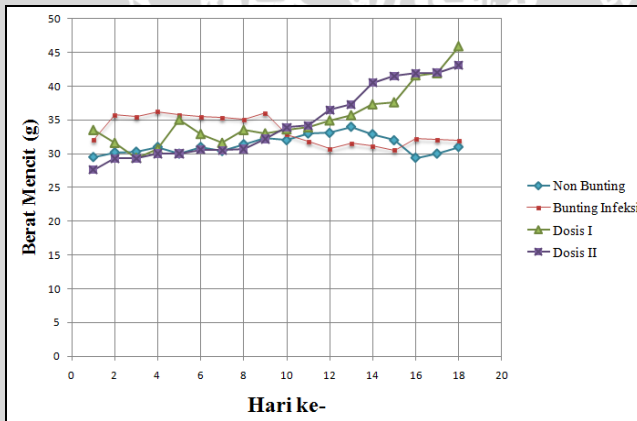


Gambar 12. Morfologi Mencit Kebuntingan Hari ke-18

Lampiran 6. Berat Badan Mencit Perlakuan



Gambar 13. Berat Badan Mencit Hingga Hari Kebuntingan ke-14.
Keterangan : Kontrol = Non Bunting; Kontrol = Bunting Infeksi; Dosis 1 = 50 mg/g *E.scaber* dan 0 mg/g *P.obtusa*; Dosis 2 = 25 mg/g *E.scaber* dan 25 mg/g *P.obtusa*



Gambar 14. Berat Badan Mencit Hingga Hari Kebuntingan ke-18.
Keterangan : Kontrol = Non Bunting; Kontrol = Bunting Infeksi; Dosis 1 = 50 mg/g *E.scaber* dan 0 mg/g *P.obtusa*; Dosis 2 = 25 mg/g *E.scaber* dan 25 mg/g *P.obtusa*