



**JUMLAH LIMFOSIT PADA MENCIT YANG DIBERI KONSUMSI EKSTRAK  
ALKOHOL DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*, A. Juzz)  
DAN DI INDUKSI OVALBUMIN**

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan dan mencapai gelar sarjana kedokteran gigi

**Oleh**

**Nurdiana Setyani  
NIM 071610101040**

**BAGIAN BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2012**



**JUMLAH LIMFOSIT PADA MENCIT YANG DIBERI KONSUMSI EKSTRAK  
ALKOHOL DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juzz)  
DAN DI INDUKSI OVALBUMIN**

**SKRIPSI**

**Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan  
memenuhi salah satu syarat untuk  
menyelesaikan dan mencapai gelar  
sarjana kedokteran gigi**

**Oleh  
Nurdiana Setyani  
NIM 071610101040**

**BAGIAN BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2012**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini kupersembahkan untuk :

1. Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan ridho-Nya,
2. Agamaku tercinta,
3. Kedua orang tuaku
4. Guru dan dosenku sejak Sekolah Dasar sampai Perguruan Tinggi, yang telah memberikan ilmu dan membimbingku,
5. Almamater Universitas Jember tercinta.

## **MOTO**

Kesempatan tidak datang dua kali, manfaatkan semua kesempatan untuk meraih apa yang menjadi keyakinanmu.  
(Anonim)

Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu; Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.  
(QS. Al-Baqarah 216)

Sesungguhnya apabila Dia (Allah) menghendaki sesuatu hanyalah berkata: “jadi !” maka jadilah.  
(QS. Yaasiin 82)

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nurdiana Setyani

NIM : 071610101040

Menyatakan dengan sesungguhnya, bahwa karya ilmiah yang berjudul :

**Jumlah Limfosit pada Mencit yang Diberi Ekstrak Alkohol Daun Mimba (*Azadirachta idica* A. Juzz ) dan Diinduksi Ovalbumin** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini terbukti tidak benar.

Jember, Februari 2012  
yang menyatakan,

**Nurdiana Setyani**  
NIM. 071610101040

## **SKRIPSI**

### **JUMLAH LIMFOSIT PADA MENCIT YANG DIBERI KONSUMSI EKSTRAK ALKOHOL DAUN MIMBA (*Azadirachta indica A. Juss*) DAN DIINDUKSI OVALBUMIN**

Oleh:  
Nurdiana Setyani  
071610101040

#### **Pembimbing:**

Dosen Pembimbing Utama : Dr., drg., I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si Dosen  
Pembimbing Anggota : Tri Handoyo, S.P., Ph.D

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul Jumlah Limfosit pada Mencit yang Diberi Ekstrak Alkohol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) dan Diinduksi Ovalbumin telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

Hari : Selasa  
Tanggal : 14 Februari 2012  
Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji,  
Ketua  
(Dosen Pembimbing Utama)

**Dr., drg., I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si**

NIP. 196705021997022001

Anggota I

Anggota II

**Tri Handoyo, SP., Ph.D**

NIP. 1971120219981001

**drg. Budi Yuwono, M. Kes**

NIP. 196709141999031002

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Jember

**drg. Hj. Herniyati, M.Kes**

NIP. 195909061985032001

## RINGKASAN

**Skripsi berjudul Jumlah Limfosit pada Mencit yang Diberi Ekstrak Alkohol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juzz) dan Diinduksi Ovalbumin;** Nurdiana Setyani 071610101040; 2012; 46 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Tanaman mimba (*Azadirachta indica* Juzz), secara empiris telah dikenal oleh masyarakat sebagai salah satu obat tradisional yang dapat mengatasi berbagai macam penyakit, seperti : cacangan, kudis, malaria, infeksi jamur dan alergi. Fenomena ini menunjukkan bahwa mimba mengandung komponen imunomodulator yang dapat memodulasi respons imun. Penelitian dilakukan pada mencit yang diinduksi alergi setelah diberi ekstrak daun Mimba.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah limfosit pada mukosa mulut mencit yang diberi ekstrak daun mimba dan diinduksi ovalbumin. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, rancangan penelitian *post test only control group design* yang dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Negeri Jember. Daun mimba diekstrak menggunakan pelarut alkohol. Penelitian ini menggunakan 45 ekor mencit kemudian dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok kontrol (KO) yang tidak diberi perlakuan dan kelompok perlakuan yang terdiri dari; KP<sub>1</sub> yang diinjeksi ovalbumin pada mukosa mulut 1 ml, KP<sub>2</sub> yang diberi ekstrak cair daun mimba 50 mg/kg/hari dan setelah hari ke 21 diinjeksi ovalbumin pada mukosa mulut 1 ml, KP<sub>3</sub> yang diberi cair daun mimba 100 mg/kg/hari dan setelah hari ke 21 diinjeksi ovalbumin pada mukosa mulut 1 ml, KP<sub>4</sub> yang diberi cair daun mimba 200 mg/kg/hari dan setelah hari ke 21 diinjeksi ovalbumin pada mukosa mulut 1 ml . Masing-masing kelompok dilakukan pengamatan pada darah dilihat dari jumlah limfosit di mukosa mulut mencit pada jam ke 6, jam ke 24 dan hari ke 7.

Hasil penelitian ini, membuktikan bahwa besarnya perbedaan pemberian jumlah dosis yang kecil tidak berpengaruh pada jumlah limfosit.

## PRAKATA

Puji syukur ke Hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul Jumlah Limfosit pada Mencit yang Diberi Ekstrak Alkohol Daun Mimba (*Azadirachta indica A. Juss*) dan Diinduksi Ovalbumin. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada yang terhormat.

1. drg. Hj. Herniyati, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. Dr., drg., I. Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan dan arahan serta semangat sampai terselesaikan skripsi ini.
3. Tri Handoyo, S.P., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan dan arahan serta semangat sampai terselesaikan skripsi ini.
4. Seluruh Staf dan Teknisi Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Negeri Jember.
5. Kedua orang tuaku, Bapak Dr. Ir. H. Moh. Setyo Poerwoko, MS dan Ibu Ir. Hj. Nurul Sjamsijah, MP yang telah memberikan kasih sayang, dukungan dan doa yang terbaik demi terselesaikannya skripsi ini.
6. Kakakku dr. Novita Nuraini. Adikku Nurlita Yanuarni, Nur Alfianti Putri yang menjadi kebanggaan dan dan kebahagiaanku selama ini.
7. Teman-teman seperjuangan yang merupakan rekan penelitian saya yaitu Nova dan Yulia, terimakasih atas kerjasamanya.
8. Sahabat-sahabatku yang telah memberi dukungan dan menemaniku dalam suka dan duka yaitu Dani, Nova, Desi, Dhita, Ria, Shofa.
9. Teman-teman seangkatan di FKG Universitas Negeri Jember

10 Semua pihak yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhirnya Penulis berharap semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi semua dan merupakan sumbangsih berharga bagi khasanah ilmu pengetahuan, terutama dibidang Kedokteran Gigi.

Jember, Februari 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>Bab 1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>Bab 2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Deskripsi Tanaman Mimba .....	4
2.1.1 Morfologi .....	4
2.1.2 Senyawa Aktif Mimba .....	5
2.1.3 Khasiat Daun Mimba .....	6
2.1.4 Efek Immunologis Mimba .....	7
2.2 Efek Ekstrak Alkohol Daun Mimba terhadap Sistem Imun ...	8
2.3 Alergi .....	9
2.4 Limfosit .....	14
2.4.1 Jenis Limfosit .....	15
2.4.2 Hubungan Limfosit terhadap Sistem Imun .....	17
2.4.3 Hubungan Limfosit terhadap Alergi .....	18
2.5 Ovalbumin sebagai Alergen .....	19
2.6 Kerangka Konseptual Penelitian .....	20
2.7 Hipotesis .....	22
<b>Bab 3. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Jenis Penelitian .....	23
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	23
3.2.1 Tempat Penelitian .....	23
3.2.2 Waktu Penelitian .....	23

3.3	Alat dan Bahan.....	23
3.3.1	Alat Penelitian.....	23
3.3.2	Bahan Penelitian.....	23
3.4	Definisi Operasional.....	24
3.4.1	Ekstrak Daun Mimba.....	24
3.4.2	Ovalbumin .....	24
3.4.3	Jumlah Limfosit .....	24
3.5	Variabel Penelitian.....	24
3.5.1	Variabel Bebas.....	24
3.5.2	Variabel Terikat.....	24
3.5.3	Variabel Terkendali.....	25
3.6	Sampel.....	25
3.6.1	Populasi Penelitian.....	25
3.6.2	Sampel Penelitian.....	25
3.7	Prosedur Penelitian.....	26
3.7.1	Tahap Persiapan.....	26
3.7.2	Tahap Pembuatan Ekstrak Daun Mimba.....	26
3.7.3	Tahap Pengelompokan dan Perlakuan Sampel.....	27
3.7.4	Pemberian Ekstrak Alkohol Daun Mimba pada Mencit	27
3.7.5	Injeksi Ovalbumin.....	27
3.7.6	Pemeriksaan Jumlah Limfosit.....	28
3.7.7	Pembuatan Sediaan Hapusan Darah.....	28
3.7.8	Pewarnaan Sediaan Hapusan Darah.....	28
3.8	Analisa Statistik.....	29
3.9	Alur Penelitian.....	30
<b>Bab 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1	Hasil Penelitian.....	31
4.2	Analisis Data.....	33
4.3	Pembahasan.....	33
<b>Bab 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1	Kesimpulan.....	36
5.2	Saran.....	36
	<b>DAFTAR BACAAN.....</b>	<b>37</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>40</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
2.1 Aktivitas Bioaktif Komponen Mimba.....	6
4.1 Hasil Penghitungan Rata-Rata Jumlah Sel Limfosit pada Mencit yang Diberi Ekstrak Alkohol Daun Mimba ( <i>A. indica</i> ) dan Diinduksi Ovalbumin Selama 21 Hari.....	31

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
2.1 Daun Mimba.....	5
2.2 Reaksi Hipersensitivitas Tipe I.....	11
2.3 Reaksi Hipersensitivitas Tipe II.....	12
2.4 Reaksi Hipersensitivitas Tipe III.....	13
2.5 Reaksi Hipersensitivitas tipe IV.....	14
2.6 Sel Limfosit.....	15
2.7 Mekanisme Penghambatan Reaksi Alergi oleh Adanya Daun Mimba.....	32

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia merupakan salah satu negara berkembang yang mempunyai cukup sumber daya alam diantaranya sumber daya alam hayati. Kondisi alam Indonesia yang cukup subur disebabkan letak geografis yang dilewati oleh garis khatulistiwa, dan memiliki iklim tropis, sangat cocok bagi tumbuh dan berkembangnya berbagai tanaman. Banyak tanaman saat ini yang tidak dikenal secara luas ternyata memiliki manfaat dan nilai ekonomis yang cukup tinggi, khususnya tanaman-tanaman yang memiliki khasiat, baik sebagai obat tradisional maupun sebagai insektisida alami (Fornswort, 1996).

Seiring dengan semakin berkembangnya penggunaan tanaman obat dalam dunia kesehatan dengan semboyan *back to nature*, keingintahuan masyarakat terhadap khasiat dan manfaat tanaman obat semakin berkembang. Informasi penggunaan tanaman obat berdasarkan pengalaman saja dinilai belum cukup, karena itu dibutuhkan penjelasan berkaitan dengan hasil penelitian obat, khususnya mimba yang dinilai penting untuk diinformasikan (Arivazghan *et al.*, 2000; Fatima *et al.*, 2005).

Tanaman mimba seiring perkembangan zaman semakin penting untuk diteliti karena hampir seluruh bagian tanamannya dapat dimanfaatkan untuk pengobatan, kosmetik, pasta gigi dan lain-lain. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa kulit batang mimba mengandung polisakarida, protein, asam amino, minyak serta beberapa metabolik sekunder. Pemanfaatan kulit batang mimba secara tradisional untuk obat demam, muntah dan penyakit kulit sudah banyak dilakukan oleh masyarakat demikian juga terhadap khasiat mimba, khususnya khasiat mimba terhadap alergi belum banyak diteliti (Harsini, 2008).

Sampai saat ini alergi masih merupakan suatu penyakit yang sulit diatasi, di rongga mulut sering menimbulkan masalah kesulitan mengunyah, menelan sehingga

menyebabkan turunnya berat badan. Obat-obat antialergi yang ada hanya mengatasi alergi sesaat, untuk kemudian alergi akan kambuh kembali. Permasalahan yang timbul dan belum terpecahkan sampai saat ini adalah belum ditemukannya obat yang poten untuk mengatasi alergi serta dengan efek samping minimal. Penelitian oleh pengusul sebelumnya membuktikan daun mimba dapat memodulasi respons imun. Di sisi lain penelitian tentang modulasi ekstrak alkoholdaun mimba terhadap alergi di rongga mulut belum pernah dilaporkan.

Gangguan kesehatan mulut atau kesehatan gigi sering terjadi pada penderita alergi yaitu nyeri gigi, ngilu atau bengkak pada gusi atau gigi, gigi berwarna kuning kecoklatan, karies gigi, gusi mudah bengkak/berdarah, uleserasi, kemerahan. Penyebabnya dapat berupa makanan, obat-obatan kedokteran gigi (anestesi). Gejala dari alergi obat anestesi adalah tanda nadi cepat, tensi turun, perasaan gelisah. Salah satu alergi yang harus diwaspadai oleh dokter gigi adalah kejadian anafilaktik shock yang disebabkan obat anestesi.

Tanaman Mimba (*Azadirachta indica* Juss), secara empiris telah dikenal oleh masyarakat sebagai salah satu obat tradisional yang dapat mengatasi berbagai macam penyakit, seperti: cacangan, kudis, malaria, infeksi jamur dan alergi. Fenomena ini menunjukkan bahwa mimba mengandung komponen imunomodulator yang dapat memodulasi respon imun. Penelitian dilakukan pada mencit yang diinduksi alergi setelah diberi ekstrak daun mimba (Roitt *et al.*, 1994; Galli *et al.*, 1999).

Alasan menggunakan sel limfosit dikarenakan jika alergen masuk ke dalam tubuh, maka sel limfosit yang paling berperan. Limfosit merupakan kunci dari sistem pertahanan tubuh, maksudnya limfosit merupakan garis pertahanan tubuh. Limfosit merespon terhadap kontak dengan mikroba dengan cara membangkitkan respon kekebalan yang efisien dan selektif yang bekerja di seluruh tubuh untuk mengeluarkan suatu benda asing (Chambell, Neil A), Sel limfosit tersebut melawan alergen yang masuk dengan cara meningkatkan jumlah sel limfosit, sehingga jika ada alergen masuk dalam tubuh maka sel limfosit akan memperbanyak diri berubah

menjadi sel plasma dan menghasilkan antibodi untuk melawan alergen yang masuk tersebut. Pemberian daun mimba, maka diharapkan sel limfosit tersebut akan turun.

Menggunakan ekstrak alkohol daun mimba dikarenakan dalam penelitian ini mengambil sari daun mimba, sehingga komponen *galic acid*, *catechin*, *epicatechin* tetap berada dalam ekstrak. Jika dengan perasan daun mimba, maka komponen dari daun mimba akan hilang.

Pemberian ekstrak alkohol daun mimba selama 21 hari mengikuti penelitian sebelumnya (Ray, 1996). Karena dengan pemberian mimba 21 hari, sudah dapat terlihat efek limfosit.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Bagaimana jumlah limfosit pada hapusan darah mukosa mulut mencit yang diberi ekstrak alkohol daun mimba (*A. indica*, Juzz) dan diinduksi ovalbumin?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

Mengetahui jumlah limfosit pada hapusan darah mukosa mulut mencit yang diberi ekstrak alkohol daun mimba (*A. indica*, Juzz) dan diinduksi ovalbumin.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu patologi klinik khususnya di bidang Kedokteran Gigi.
2. Dapat digunakan sebagai dasar atau acuan penelitian lebih lanjut mengenai khasiat daun mimba bagi peneliti-peneliti yang lainnya.

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Deskripsi Tanaman Mimba**

Mimba (*Azadirachta indica* Juss) termasuk dalam famili *Meliaceae*. Tanaman ini dapat dijumpai di seluruh penjuru tanah air. Tanaman ini berbentuk pohon dengan ketinggian 20 meter dan dapat tumbuh di daerah tropis maupun subtropik khususnya di tanah asam. Tanaman mimba tidak menghasilkan buah yang enak atau daun yang dapat disayur. Bagian tanaman yang paling banyak dimanfaatkan adalah bagian bijinya. Biji mimba dapat dimanfaatkan sebagai pestisida alami yang ramah lingkungan. Bagian tanaman yang lain yang banyak digunakan adalah daunnya, terutama dimanfaatkan sebagai obat (Sukrasno, 2003). Tanaman ini telah dimanfaatkan sebagai obat berbagai macam penyakit, antara lain sebagai obat cacing, obat kudis, anti alergi, obat malaria, pembangkit selera makan, obat lambung, anti jamur dan anti kanker (Grainage and Salem, 1987; Badam *et al.*, 1999; Arivazhagan *et al.*, 2000).

#### **2.1.1 Morfologi**

Tanaman mimba tersebar di seluruh penjuru Indonesia, hal ini dapat dilihat dari beragamnya nama-nama daerah tumbuhan ini. Misalnya: imba, mimbo, mimba (Jawa); intara (Bali); meupleuh (Madura); mambu (Melayu). Adapun ciri-ciri mimba (Ketkat 1975; Djamin and Ginting, 1991) adalah sebagai berikut.

#### **Daun Mimba**

Daun mimba merupakan daun majemuk yang tersusun saling berhadapan di petiol atau tangkai daun. Bentuknya lonjong dengan tepi bergerigi. Ujung daun lancip, sedangkan pangkal daun meruncing. Susunan tulang daun mimba menyirip. Lebar daun mimba sekitar 2 cm dan panjang 5 cm. Bentuk daun mimba memiliki kemiripan dengan daun mindi (*Melia azedarach*). Namun daun mindi memiliki petiolus atau anak tangkai daun dan letak daun utamanya tersusun

simetris. Sementara itu helaian daun mimba tidak terbelah simetris (Sukrasno, 2003). Daun-daun tua gugur pada bulan Februari dan Maret.



Gambar 2.1. Daun Mimba  
(<http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id>) 13 Maret 2010

### 2.1.2 Senyawa Aktif Mimba

Daun *Azadirachta indica* Juss mengandung senyawa-senyawa diantaranya adalah  $\beta$ -sitosterol, hyperoside, nimbolide, quercetin, quercitrin, rutin, azadirachtin, dan nimbine. Beberapa diantaranya diungkapkan memiliki aktivitas antikanker. Daun *Azadirachta indica* Juss mengandung nimbin, nimbine, 6-desacetylbinbine, nimbolide dan quercetin (Neem Foundation, 1997).

Menurut Biswas *et al.* (2002) khasiat nimba ini disebabkan oleh nimba menghasilkan beberapa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis sebagai antiinflamasi, antipiretik, *antiarthritic*, *spermicidal*, antifungi, antibakterial, antimalarial, antitumor, antioksidan.

Mimba, terutama dalam daunnya mengandung beberapa komponen dari produksi metabolit sekunder yang diduga sangat bermanfaat, baik dalam bidang pertanian (pestisida dan pupuk), maupun farmasi (kosmetik dan obat-obatan). Beberapa diantaranya adalah *azadirachtin*, *salanin*, *meliantriol*, *nimbin* dan *nimbidin* (Ruskin, 1993). *Azadirachtin* sendiri terdiri dari sekitar 17 komponen dan komponen yang mana yang paling bertanggung jawab sebagai pestisida atau obat, belum jelas diketahui (Rembold, 1989). Mimba tidak membunuh hama secara cepat, namun mengganggu hama pada proses makan,

pertumbuhan, reproduksi dan lainnya (Senrayan, 1997). Azadirachtin merupakan molekul kimia  $C_{35}H_{44}O_{16}$  yang termasuk dalam kelompok triterpenoid.

*Galic acid, epicatechin, catechin* bertanggung jawab untuk menghambat generasi chemilumine oleh PMN sitoplasma manusia, menunjukkan bahwa senyawa ini menghambat aktivitas PMN selama peradangan (Biswas, 2002).

Tabel 2.1 Aktivitas Bioaktif Komponen Mimba (Biswas *et al.*, 2002)

Komponen	Sumber	Aktivitas Biologis
<i>Nimbidin</i>	Daun, kulit batang, biji	Anti-inflamasi, antitiartritik, antipiretik, hipoglikemik, antigastrik, ulser, spermisidal, antijamur, antibakteri, diuretic
<i>Sodium nimbidate</i>		
<i>Nimbin</i>	Daun, kulit batang	
<i>Nimbolid</i>	Biji	Anti-inflamasi
<i>Gedunin</i>	Minyak biji	Spermisidal
<i>Azadirachtin</i>	Minyak biji	Antibakteri, antimalaria
<i>Mahmodin</i>		Antijamur, antimalaria
<i>Galic acid</i>	Kulit batang, daun	Antimalaria
<i>Epicatechin, catechin</i>	Kulit batang, daun	Antibakteri, imunodulator
<i>Margolon, margolone</i>	Daun	Antiinflamasi
<i>Isomargolon</i>	Kulit batang	Imunodulator
<i>Cylic trisulphide, cylic</i>	Kulit batang, daun	Antibakteri
<i>Tetrasulphide</i>		Antijamur
<i>Polisakarida</i>	Kulit batang	Antiinflamasi
<i>Polisakarida Gla</i>		Anti tumor
<i>Polisakarida Glla, Glla</i>	Kulit batang	Antiinflamasi
<i>NB-II pedoglikan</i>	Kulit batang	Imunodulator

### 2.1.3 Khasiat Daun Mimba

Daun mimba mempunyai banyak sekali manfaat, terutama dalam dunia kesehatan, namun penggunaannya secara tradisional di Indonesia kurang populer. Seiring dengan semakin berkembang penggunaan tanaman obat dalam dunia kesehatan dengan semboyan *back to nature*, keingintahuan masyarakat terhadap khasiat dan manfaat tanaman obat semakin berkembang. Informasi yang mendukung pemanfaatan daun mimba diperoleh juga dari negara tetangga yang memiliki populasi mimba terbesar di dunia, yaitu India. Di Indonesia, daun

mimba sudah dicantumkan dalam buku resmi mengenai obat dari bahan alam. Di beberapa negara seperti India, tanaman mimba digunakan sebagai pencegah kehamilan karena terbukti dapat mematikan sperma. Begitu juga artikel-artikel ilmiah terutama dari para penulis India telah banyak mengungkap berbagai aktivitas farmakologi daun mimba misalnya sebagai antijamur, antivirus, obat cacing, anti alergi, anti kanker baik in vitro maupun in vivo (Arivazghan *et al.*, 2000; Fatima *et al.*, 2005).

Mimba (*Azadirachta indica juss*) yang memiliki kandungan senyawa *azadirachtin, salanine, meliantrirole, nimbin, nimbolide, mahmodine, gallic acid, catechin, epicatechin, margolone, margolonone, isomargolonone, cyclictr-sulphide, cyclictetrasulphide* dan *polisakarida* bermanfaat sebagai antijamur, antimalaria, antibakteri, antipiretik dan imunomodulator. Sampai saat ini bagian tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional adalah daun dan bijinya (Mirin, 1997; Kardiman, 1999; Biswas *etal.*, 2002). Masyarakat juga memanfaatkan khasiat mimbadengan cara meminum rebusan atau perasan daun mimba untuk mengobati berbagai macam penyakit, seperti cacangan, kudis, malaria, infeksi jamur dan mengatasi alergi (Ganguli, 2002; Goel and Sairam, 2002). Selain itu masyarakat India memanfaatkan daun dan biji mimba sebagai obat nyamuk dengan cara menumbuk dan mengoleskannya pada tubuh. Serabut mimba juga dimanfaatkan untuk membersihkan dan memutihkan gigi. Di bidang pertanian, mimba dapat digunakan sebagai insektisida, antipatogen dan fungisida alami yang terbukti aman bagi manusia dan hewan (Dang *et al.*, 2003; Sukrasno, 2003).

#### **2.1.4 Efek Imunologis Mimba**

Efek imunologis mimba sudah dapat diketahui dari beberapa penelitian yang telah dilakukan. Mimba dapat memodulasi PMN, Limfosit, Monosit dan Makrofag sehingga mempengaruhi aktivitas fagositosis. Dari hasil penelitian tersebut diketahui mimba dapat memodulasi respon imunitas alami, seluler dan humoral (Upadhayay *etal.*, 1992; Sairam *et al.*, 1997; Sastrodiharjo, 1998). Beberapa penelitian yang membuktikan efek imunomodulator mimba antara lain oleh Ray *et al.* (1996) menyebutkan mimba dapat memodulasi respon imun

seluler dan humoral pada mencit yang diimunisasi dengan ovalbumin. Modulasi respon imun humoral tersebut meliputi peningkatan level Ig G, Ig M, titer antibodi anti-ovalbumin.

## 2.2 Efek Ekstrak Alkohol Daun Mimba terhadap Sistem Imun

Dalam ilmu kimia organik, alkohol atau alkanol adalah istilah yang umum untuk senyawa organik yang memiliki gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada atom karbon dimana atom karbon itu sendiri juga terikat pada atom hidrogen atau atom karbon yang lain. Dalam istilah umum, yang disebut alkohol adalah etanol atau *grain alcohol*. Etanol tidak terlalu beracun karena tubuh dapat menguraikannya dengan cepat. Alkohol digunakan secara luas dalam industri dan ilmu pengetahuan sebagai pereaksi, pelarut, dan bahan bakar. Etanol tidak terlalu berbau karena tubuh dapat menguraikannya dengan tepat. Alkohol banyak digunakan sebagai pelarut. Alkohol bersifat mudah menguap karena merupakan rantai karbon C<sub>1</sub>s ampai C<sub>5</sub> mempunyai titik didih 0° - 50° (Anang, 2005).

Potensi daun mimba sebagai imunostimulator dibuktikan beberapa peneliti meliputi respons imun humoral dan seluler, antara lain: fagositosis, ekspresi MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas I dan II, produksi IFN  $\gamma$ , CD4, CD8, Th 1, TNF- $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-1  $\beta$  (Upadhyay *et al.*, 1992; Ray *et al.*, 1996; Talwar *et al.*, 1997). Berbagai penelitian menggunakan cara pengambilan sari dalam tanaman mimba yang disebut ekstraksi. Salah satu cara ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak dalam jumlah bahan aktif yang optimal dengan menggunakan kombinasi etanol dan air (Voight, 1995).

Mimba terbukti dapat memodulasi aktivitas makrofag dalam *innate respons* yang telah terpapar oleh *C albicans* (Dewanti, 2008). *C albicans* beserta produknya berinteraksi dengan membran sel makrofag melalui sinyal CD14 dan TLR2, TLR4 yang bergantung TRAF6 (*TNF receptor-associated factor*), selanjutnya akan mempengaruhi fosfolipase. Aktivitas ini mempengaruhi aktivitas I- $\kappa$ B yang berfungsi mengikat NF- $\kappa$ B. Setelah terjadi pelepasan I- $\kappa$ B, maka terjadi peningkatan aktivitas faktor transkripsi NF- $\kappa$ B yang menstimulasi ekspresi gen yang mempengaruhi produksi TNF- $\alpha$  dan aktivitas fagositosis

(Dewanti, 2008). Selanjutnya makrofag akan pecah, melepaskan isi enzimatisnya ke dalam vakuola dan bercampur dengan *candida* yang diingesti. Proses ini disebut degranulasi. Maturasi fagosom juga diikuti dengan perubahan pH menjadi asam dan beraktivitas hidro litik dan disertai percepatan respirasi yang mengakibatkan aktifnya molekul Oksigen Reaktif (ROI) dan NO (Nitrit Oksida), selanjutnya menyebabkan pembunuhan mikroba. Aktivitas tersebut menyebabkan terjadinya perubahan aktivitas fagositosis. Aktivitas makrofag lainnya yaitu mengekspresikan sitokin TNF- $\alpha$  yang kemungkinan terjadi sesaat kemudian dengan berlangsungnya inflamasi semakin lama akan terjadi penurunan (Abbas *et al.*, 2000). Peningkatan reseptor Fc dan protein membran mikroba akan memicu pelepasan ROI (*Reactive Oxygen Intermediated*), sedangkan reseptor komplemen memicu fagositosis tanpa diikuti terjadinya *superoxide burst* yang kuat oleh makrofag. Komponen yang berperan dalam proses mikrobisidal dapat disekresikan ke dalam lingkungan makrofag, sehingga aktivasi makrofag dapat menghasilkan efek mikrobisidal intraseluler maupun ekstraseluler (Abbas *et al.*, 2000).

### 2.3 Alergi

Definisi alergi yang pertama kali dikemukakan oleh Von Pirquet adalah suatu istilah yang merujuk pada semua bentuk perubahan reaktifitas sistem imun yang disebabkan oleh stimulasi antigen yang selain menghasilkan respon melindungi tubuh host (imunitas) juga dapat menimbulkan respon yang merugikan bagi antigen (hipersensitivitas). Dahulu istilah alergi dipakai untuk menggambarkan semua manifestasi sistem imun baik yang menguntungkan maupun yang merugikan bagi tubuh, akan tetapi saat ini istilah yang dipakai untuk menggambarkan manifestasi sistem imun untuk melawan antigen asing maupun *self* antigen yang dapat bersifat menguntungkan maupun merugikan tubuh disebut respon imun. Sedangkan istilah alergi sendiri khusus dipakai untuk menggambarkan keadaan respon imun yang membahayakan bagi tubuh (Galli *et al.*, 1999).

Saat ini istilah alergi dibatasi lagi menjadi reaksi alergi yaitu suatu keadaan yang menggambarkan respon imun terhadap antigen dari lingkungan atau biasa disebut alergen. Alergen tersebut dapat berupa makanan, obat-obatan, pollen dan lain lain (Roitt *et al.*, 1994; Galli *et al.*, 1999).

### **2.3.1 Reaksi Sistem Imun terhadap Alergi**

Sistem imun adalah suatu rangkaian dari seluruh sel, jaringan dan organ yang bekerja bersama-sama untuk bertahan dari serangan yang merugikan dari luar tubuh, seperti mikroba, infeksi disebabkan oleh organisme seperti bakteri, virus, parasit dan jamur. Hal ini disebabkan karena tubuh manusia merupakan tempat yang ideal bagi mikroba, maka sistem imun inilah yang bekerja dalam proses pertahanan dan menghancurkannya. Sistem imun merupakan sistem yang menakjubkan karena dapat mengenali jutaan mikroorganisme yang berbeda dan memproduksi sekresi yang berguna untuk menghancurkannya.

Imunitas atau kekebalan dapat diartikan juga sebagai sistem pada organisme yang bekerja melindungi tubuh terhadap pengaruh biologis luar dengan mengidentifikasi dan membunuh patogen serta sel tumor, sehingga tubuh bebas patogen dan aktivitas dapat berlangsung dengan baik. Reaksi alergi terjadi pada jam ke 6, jam 24 dan hari ke 7 dikarenakan reaksi imun pada jam dan hari tersebut dalam tubuh bereaksi.

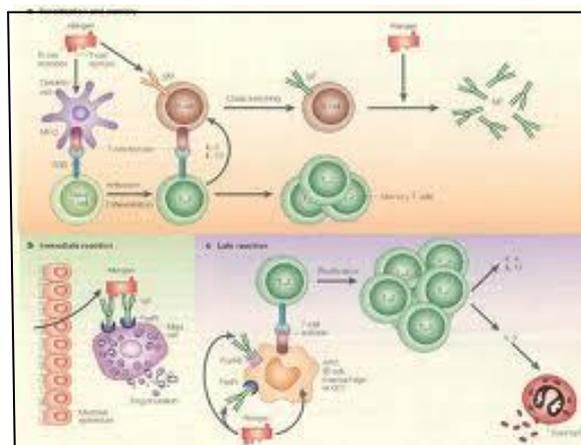
Selain dapat menghindarkan tubuh diserang patogen, imunitas juga dapat menyebabkan penyakit, diantaranya hipersensitivitas dan autoimun. Hipersensitivitas adalah respon imun yang merusak jaringan tubuh sendiri. Reaksi hipersensitivitas terbagi menjadi empat tipe berdasarkan mekanisme dan lama waktu reaksi hipersensitif, yaitu reaksi hipersensitivitas tipe I, tipe II, tipe III, dan tipe IV.

#### **Hipersensitivitas Tipe I (Hipersensitivitas Tipe Cepat Atau Anafilaksis)**

Reaksi hipersensitivitas tipe I merupakan reaksi alergi yang terjadi karena terpapar antigen spesifik yang dikenal sebagai alergen. Dapat terpapar dengan cara ditelan, dihirup, disuntik, ataupun kontak langsung. Perbedaan antara respon

imun normal dan hipersensitivitas tipe I adalah adanya sekresi IgE yang dihasilkan oleh sel plasma. Antibodi ini akan berikatan dengan reseptor Fc pada permukaan jaringan sel mast dan basofil. Sel mast dan basofil yang dilapisi oleh IgE akan tersensitisasi (fase sensitisasi). Karena sel B memerlukan waktu untuk menghasilkan IgE, maka pada kontak pertama, tidak terjadi apa-apa. Waktu yang diperlukan bervariasi dari 15-30 menit hingga 10-20 jam.

Adanya alergen pada kontak pertama menstimulasi sel B untuk memproduksi antibodi, yaitu IgE. IgE kemudian masuk ke aliran darah dan berikatan dengan reseptor di sel mastosit dan basofil sehingga sel mastosit atau basofil menjadi tersensitisasi. Pada saat kontak ulang dengan alergen, maka alergen akan berikatan dengan IgE yang berikatan dengan antibodi di sel mastosit atau basofil dan menyebabkan terjadinya granulasi. Degranulasi menyebabkan pelepasan mediator inflamasi primer dan sekunder. Mediator primer menyebabkan eosinofil dan neutrofil serta menstimulasi terjadinya urtikaria, vasodilatasi, meningkatnya permeabilitas vaskular, Sedangkan mediator sekunder menyebabkan peningkatan pelepasan metabolit asam arakidonat (prostaglandin dan leukotrien) dan protein (sitokin and enzim).



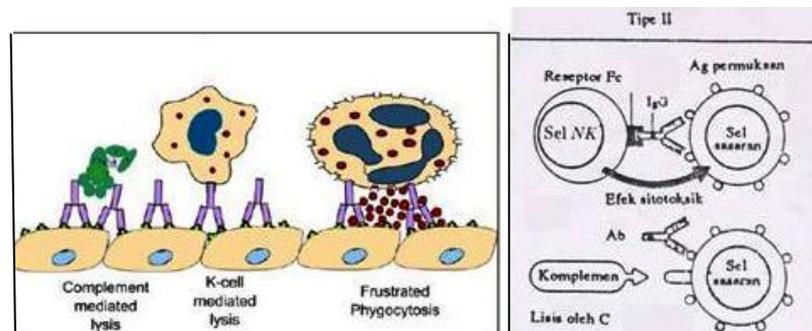
Gambar2.2 Reaksi Hipersensitivitas Tipe I (Buku Ajar IPD, 2006)

Hipersensitivitas Tipe II (Reaksi Sitotoksik yang Memerlukan Bantuan Antibodi)

Penggolongan reaksi hipersensitivitas semula didasarkan atas perbedaan mekanisme kerusakan jaringan yang diakibatkannya. Baik reaksi tipe II maupun

reaksi tipe III melibatkan IgG dan IgM. Perbedaannya adalah bahwa pada reaksi tipe II antibodi ditujukan kepada antigen yang terdapat pada permukaan sel atau jaringan tertentu, sedangkan pada reaksi tipe III antibodi ditujukan kepada antigen yang terlarut dalam serum. Jadi pada reaksi tipe II, antibodi dalam serum bereaksi dengan antigen yang berada pada permukaan suatu sel atau yang merupakan komponen membran sel tertentu yang menampilkan antigen bersangkutan.

Seringkali suatu substansi berupa mikroba dan molekul-molekul kecil lain atau haptan, melekat pada permukaan sel dan bersifat sebagai antigen. Pada umumnya antibodi yang ditujukan kepada antigen permukaan sel bersifat patogenik, karena kompleks antigen-antibodi pada permukaan sel sasaran akan dihancurkan oleh sel efektor, misalnya oleh makrofag maupun oleh neutrofil dan monosit, atau limfosit T-sitotoksik dan sel NK sehingga ada kemungkinan menyebabkan kerusakan sel itu sendiri. Pada keadaan ini sulit membedakan antara reaksi imun yang normal dengan reaksi hipersensitivitas.



Gambar 2.3 Reaksi Hipersensitivitas Tipe II (Buku Ajar IPD, 2006)

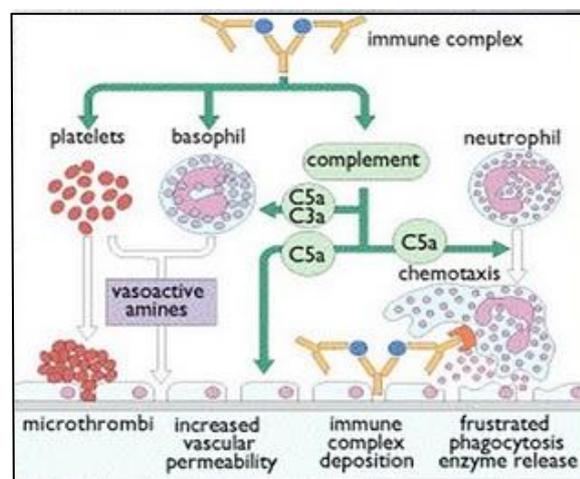
### Hipersensitivitas Tipe III ( Reaksi Kompleks Imun )

Kompleks imun terbentuk setiap kali antibodi bertemu dengan antigen, tetapi dalam keadaan normal pada umumnya kompleks ini segera disingkirkan secara efektif oleh jaringan retikuloendotel, tetapi ada kalanya pembentukan kompleks imun menyebabkan reaksi hipersensitivitas.

Keadaan imunopatologik akibat pembentukan kompleks imun dalam garis besar dapat digolongkan menjadi 3 golongan sebagai berikut.

1. Dampak kombinasi infeksi kronis yang ringan dengan respons antibodi yang lemah, menimbulkan pembentukan kompleks imun kronis yang dapat mengendap di berbagai jaringan.
2. Komplikasi dari penyakit autoimun dengan pembentukan autoantibodi secara terus menerus yang berikatan dengan jaringan.
3. Kompleks imun terbentuk pada permukaan tubuh, misalnya dalam paru-paru, akibat terhirupnya antigen secara berulang kali.

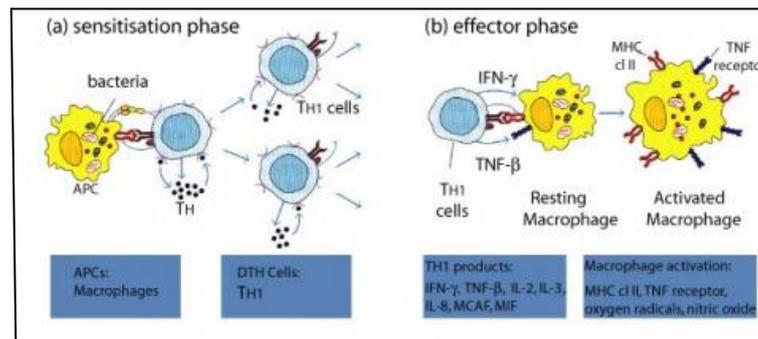
Pemaparan pada antigen dalam jangka panjang dapat merangsang pembentukan antibodi yang umumnya tergolong IgG dan bukan IgE seperti halnya pada reaksi hipersensitivitas tipe I. Pada reaksi hipersensitivitas tipe III, antibodi bereaksi dengan antigen bersangkutan membentuk kompleks antigen antibodi yang akan menimbulkan reaksi inflamasi. Aktivasi sistem komplemen, menyebabkan pelepasan berbagai mediator oleh mastosit. Selanjutnya terjadi vasodilatasi dan akumulasi PMN yang menghancurkan kompleks. Di lain pihak proses itu juga merangsang PMN sehingga sel-sel tersebut melepaskan isi granula berupa enzim proteolitik diantaranya proteinase, kolegenase, dan enzim pembentuk kinin. Apabila kompleks antigen-antibodi itu mengendap di jaringan, proses diatas bersama-sama dengan aktivasi komplemen dapat sekaligus merusak jaringan sekitar kompleks. Reaksi ini dapat terjadi saat terdapat banyak kapiler twisty (glomeruli ginjal, kapiler persendian).



Gambar 2.4 Reaksi Hipersensitivitas Tipe III (Buku Ajar IPD, 2006)

### Hipersensitivitas Tipe IV (*Delayed hypersensitivity*)

Reaksi tipe ini tidak seperti tiga tipe lainnya, dimana reaksi ini dimediasi oleh antibodi, tetapi dimediasi oleh efektor sel T yang spesifik terhadap antigen. memerlukan waktu sekitar 2-3 hari untuk berkembang.

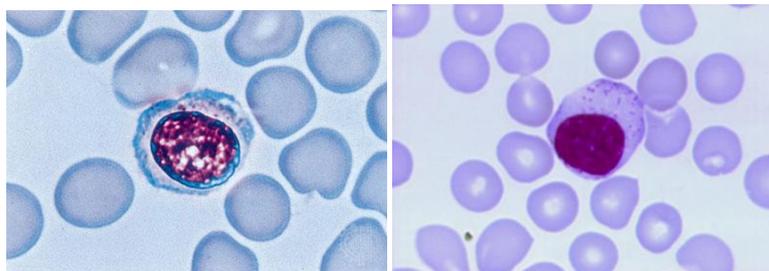


Gambar 2.5 Reaksi Hipersensitivitas Tipe IV (Buku Ajar IPD, 2006)

Limfosit merupakan kunci dari sistem pertahanan tubuh dalam reaksi alergi. Limfosit dapat berperan di semua tipe. Pada reaksi alergi, limfosit penting untuk pengaktifan sel yang lain misalnya eosinophil dan basophil. Limfosit T berperan mengaktifkan limfosit B untuk menghasilkan immunoglobulin.

## 2.4 Limfosit

Limfosit adalah sel berinti satu dalam darah perifer. Limfosit berbentuk bulatan oval yang dikelilingi oleh pinggir sitoplasma sempit berwarna biru yang mengandung sedikit granula. Bentuk kromatin inti menyerupai pengelompokan jala-jala yang mempunyai hubungan ke dalam. Limfosit ukurannya berbeda-beda yang kecil sampai yang besar seukuran granulosit (Price and Wilson, 1995). Barangkali perbedaan ukuran merupakan segi yang paling tidak penting pada heterogenitas limfosit. Sel-sel limfosit berbeda satu dengan yang lainnya dalam hal proses perkembangannya, siklus hidupnya, masing-masing mengalir melalui jalur yang berbeda dalam tubuh, memiliki sifat permukaan yang berlainan dan yang paling penting memiliki fungsi yang berlainan (Price and Wilson, 1995).



Gambar2.6 Sel Limfosit  
([fastabiqkhairat.blogspot](http://fastabiqkhairat.blogspot))

Menurut Cormark (1994), limfosit merupakan 20-50% leukosit darah. Karena itu limfosit dalam darah tepi jumlahnya lebih kurang setengah dari jumlah neutrofil. Dalam jumlah absolut, terdapat 1500 sampai 400 limfosit per milimeter kubik darah.

Limfosit terdapat di seluruh tubuh, tetapi cenderung terpusat dalam jaringan-jaringan tertentu (limfoid) yang merupakan suatu sistem yang terkoordinasi, antara lain kelenjar limfe, limfa, timus, jaringan limfoid yang terhitung dengan permukaan mukosa dan sumsum tulang Price and Wilson (1935).

#### 2.4.1 Jenis Limfosit

Berdasarkan ukurannya, limfosit dibagi menjadi dua, yaitu.

##### a. Limfosit Kecil

Limfosit kecil mendominasi dalam darah, memiliki inti sferis yang mana terlihat lekukan kecil pada salah satu intinya yang bulat, kromatinnya padat dan tampak sebagai gumpalan kasar, sehingga inti lebih terlihat gelap pada sajian biasa. Sitoplasmanya sangat sedikit dan pada hapusan darah tampak sebagai tepian tipis di sekitar inti. Limfosit hidup bersifat motil dan dapat menyusup diantara sel-sel endotel pembuluh darah. Mereka juga mampu bermigrasi melalui epitel basal lainnya (Cormark, 1994; Jonquira *et al.*, 1997).

Berdasarkan sifat fungsionalnya limfosit kecil digolongkan dalam dua kelompok besar sebagai berikut.

### 1. Limfosit-T

Limfosit-T timbul dari dalam sel induk sumsum tulang yang bermigrasi di timus. Kemudian berdiferensiasi menjadi sel-T dewasa dan meninggalkan timus. Sel-T matur ikut aliran darah dan aliran limfe dan juga berada di jaringan limfoid perifer (Robbins dan Kumar, 1995).

Sel-T juga bertanggung jawab terhadap reaksi imun seluler dan mempunyai reseptor permukaan spesifik untuk mengenali antigen. Sel T yang diaktifkan mempunyai sedikit retikulum endoplasma kasar, tetapi penuh ribosom bebas (Leeson *et al.*, 1996).

### 2. Limfosit B

Jumlah limfosit B dalam total limfosit normal pada manusia adalah sekitar 15%. Nilai limfosit B mendapat rangsangan yang sesuai, akan membelah diri beberapa kali dan berdiferensiasi menjadi sel plasma dalam jaringan dan menghasilkan immunoglobulin (Jonquiera *et al.*, 1997). Limfosit B terdiri atas sel-sel khusus penghasil antibodi (Robbins dan Kumar, 1995).

Sedangkan menurut Lessonet *al.* (1995), limfosit ini bertugas untuk memproduksi antibodi (*humoral antibody response*) yang beredar dalam peredaran darah dan mengikat secara khusus dengan antigen asing-diikat antibodi (*antibody-coated foreign antigen*). Kompleks ini mempertinggi kemampuan fagositosis dan penghancuran oleh sel pembunuh (*Nature Killer cell* atau *NK cell*) dari organisme yang menyerang.

### b. Limfosit Besar

Limfosit besar memiliki inti yang sedikit lebih besar dari limfosit kecil. Intinya bulat atau bengkok kecil pada salah satu sisinya. Pada mulanya sangat sulit membedakan limfosit kecil dan monosit, yang seintas agak mirip. Namun pada umumnya limfosit besar pada umumnya sedikit lebih kecil dari monosit dan jumlah sitoplasmanya tidak sebanyak pada monosit, dan meskipun intinya mungkin berlekuk kecil, tidak pernah berbentuk ginjal seperti pada monosit. Di lain pihak, bila dibandingkan dengan limfosit kecil, limfosit besar memiliki lebih banyak sitoplasma dan tingkat basofilia sitoplasma yang seimbang.

Berdasarkan gambaran histologisnya, Hammersen (1993) membagi limfosit menjadi dua yaitu limfosit magnus dan parvus. Limfosit magnus mempunyai sitoplasma lebih tebal, lebih banyak mengandung sitoplasma pucat dan mempunyai granula azurofilik lebih besar daripada limfosit parvus.

#### 2.4.2 Hubungan Limfosit terhadap Sistem Imun

Imunitas adalah keadaan kebal terhadap suatu infeksi atau efek patologik suatu substansi. Kekebalan itu merupakan daya ketahanan tubuh terhadap segala benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Reaksi tubuh tersebut dinamakan reaksi imunologik dan respon imunologik (Mahar, 1998).

Gunawan dan Sumadiono (2007) menyatakan bahwa ketahanan tubuh dipertahankan oleh sistem imun non spesifik (*innate*) dan spesifik (*adaptive*).

##### a. Sistem Imun Nonspesifik

Sistem imun nonspesifik dapat memberikan respon langsung terhadap antigen, sistem ini disebut nonspesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu. Komponen sistem imun nonspesifik terdiri atas pertahanan fisik dan mekanik, biokimiawi, humoral dan seluler.

Dalam sistem pertahanan fisik dan mekanik kulit, mukosa, silia saluran nafas, batuk dan bersin akan mencegah masuknya berbagai kuman patogen ke dalam tubuh. Adapun bahan yang disekresi mukosa saluran nafas, kelenjar sebaceous kulit, telinga, spermin dalam semen mengandung bahan yang berperan dalam pertahanan tubuh secara biokimiawi.

Pertahanan nonspesifik humoral terdiri dari berbagai bahan seperti komplemen, interferon, fagosit (makrofag, neutrofil), *tumor necrosis faktor* (TNF) dan *C-Reactive protein* (CRP). Komplemen berperan meningkatkan fagositosis (opsonisasi) dan mempermudah destruksi bakteri dan parasit. Interferon menyebabkan sel jaringan yang belum terinfeksi menjadi tahan virus. Di samping itu interferon dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik *natural Killer Cell* (sel NK). Sel yang terinfeksi virus atau menjadi ganas akan menunjukkan perubahan di permukaannya sehingga dikenali oleh sel NK yang kemudian membunuhnya. *Natural Killer Cell* (sel NK), adalah sel limfoid yang ditemukan dalam sirkulasi

dan tidak mempunyai ciri sel limfoid dari sistem imun spesifik, sehingga disebut sel non B non T (sel NBNT) atau sel populasi ketiga. Sel NK dapat menghancurkan sel yang mengandung virus atau sel neoplasma. Fagosit atau Makrofag dan sel NK berperan dalam sistem imun nonspesifik seluler. Dalam kerjanya sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik. Penghancuran kuman terjadi dalam beberapa tingkat, yaitu kemotaksis, menangkap, memakan, (fagositosis), membunuh dan mencerna (Gunawan and Sumadiono, 2007)

#### b. Sistem Imun Spesifik

Sistem imun spesifik terdiri dari sistem imun spesifik humoral dan seluler. Yang berperan dalam sistem imun spesifik humoral adalah limfosit B atau sel B yang jika dirangsang oleh benda asing akan berpoliferasi menjadi sel plasma yang dapat membentuk antibodi (imunoglobulin). Selain itu juga berfungsi sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC)(Gunawan and Sumadiono, 2007)

### **2.4.3 Hubungan Limfosit terhadap alergi**

Von Pirquet (1906), memperkenalkan istilah alergi untuk suatu keadaan yang disebabkan oleh reaksi imunologik spesifik. Yang ditimbulkan oleh alergen sehingga pada umumnya dalam pertahanan seluler dan humoral organisme terhadap benda asing, leukosit sangat berperan. Sel-sel darah yang berperan dalam kejadian inflamasi alergik ini adalah sel darah putih atau leukosit dengan turunannya; neutrofil, basophil, eosinophil, limfosit, mastosit makrofag, sel plasma, sel epitel dan lain-lain. Hipersensitivitas tipe I ditengahi oleh IgE yang dikeluarkan dari mastosit dan basofil. Hipersensitivitas tipe II muncul ketika antibodi melilit pada antigen sel pasien, menandai mereka untuk penghancuran. Hal ini juga disebut hipersensitivitas sitotoksik, dan ditengahi oleh antibodi IgG dan IgM. Kompleks imun (kesatuan antigen, protein komplemen dan antibodi IgG dan IgM) ada pada berbagai jaringan yang menjalankan reaksi hipersensitivitas tipe III. Hipersensitivitas tipe IV (juga diketahui sebagai selular) biasanya membutuhkan waktu antara dua dan tiga hari untuk berkembang. Reaksi tipe IV

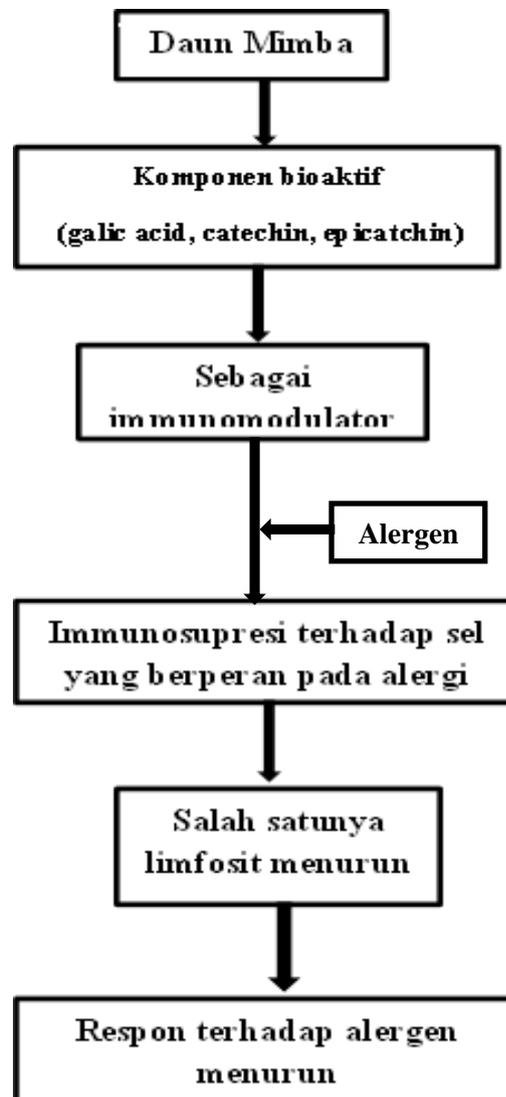
ikut serta dalam berbagai autoimun dan penyakit infeksi, tetapi juga dalam ikut serta dalam contact dermatitis. Reaksi tersebut ditengahi oleh sel T, monosit dan makrofag (Abbas, 2000).

## 2.5 Ovalbumin sebagai Alergen

Ovalbumin (OVA) merupakan protein utama yang berasal dari putih telur berupa glikoprotein dengan besar molekul 45.000 dalton. Molekulnya terdiri dari polipeptida dengan dua atau lebih gugus fosfat dengan rantai manosa dan residu glikosamin (Kang *et al.*, 1999). Sensitivitas dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah Th2. Hal tersebut telah dibuktikan pada banyak penelitian. Kang *et al.* (1999), membuktikan bahwa dengan pemberian ovalbumin secara oral dengan dosis 2,5-250 mg pada mencit jantan selama 4 minggu menyebabkan terjadinya toleransi respon imun mencit bertahan ke arah Th2 dominan setelah 26 minggu meskipun respon imun terhadap Th1 juga terbentuk. Hal tersebut juga dibuktikan oleh Morokata *et al.* (2000), dimana mencit yang disensitisasi dengan OVA dosis tinggi (lebih dari 50 mikrogram) akan menyebabkan timbulnya sitokin Th2 yang ditandai meningkatnya IL-4, IL-5 dan menurunnya IFN- $\gamma$ . Pada pemeriksaan paru-paru mencit tersebut didapatkan infiltrasi eosinofil dalam jumlah tinggi. Penelitian yang dilakukan Akiyana *et al.* (2001), membuktikan mencit yang diberi OVA peroral sebanyak 0,1 mg selama 9 minggu menunjukkan peningkatan produksi IgE spesifik terhadap OVA, peningkatan respon IgG1, peningkatan serum histamin. Penelitian Saloga *et al.* (1993) membuktikan mencit yang disensitisasi OVA dengan cara inhalasi tiap hari selama 10 hari menunjukkan peningkatan serum IgE dan responsivitas jalan nafas. Apabila 2 hari kemudian mencit tersebut disuntikkan OVA secara intradermal kemudian dilakukan tes kulit akan terbentuk *wheal* yang berarti menunjukkan adanya reaksi hipersensitivitas cepat. Reaksi positif tersebut dihubungkan dengan adanya reaksi hipersensitivitas cepat atau reaksi tipe 1. Reaksi positif tersebut dihubungkan dengan adanya degranulasi sel mast. Saloga *et al.* (1993) juga

membuktikan pada mencit yang diolesi OVA dikulitnya setelah 14 hari disensitisasi OVA juga menunjukkan adanya peningkatan antibodi IgE dan O<sub>g</sub>GI yang spesifik terhadap OVA serta terjadi peningkatan total serum IgE. Dan secara invitro dapat juga terdeteksi. Pemberian ovalbumin sebagai sensitisasi untuk merangsang respon alergi secara intraperitoneal banyak dilakukan pada banyak penelitian disebabkan pemberian OVA mudah dikontrol dosisnya dibandingkan dengan yang secara inhalasi dan oral (Kang *et al.*, 1999).

## 2.6 Kerangka Konseptual Penelitian



Bagan 2.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Penelitian sebelumnya membuktikan daun mimba dapat memodulasi respons imun. Di sisi lain penelitian tentang modulasi ekstrak alkohold daun mimba terhadap alergi di rongga mulut belum pernah dilaporkan.

Gejala dari alergi obat anastesi adalah tanda nadi cepat, tensi turun, perasaan gelisah. Salah satu alergi yang harus diwaspadai oleh dokter gigi adalah kejadian *anafilaktik shock* yang disebabkan obat anastesi.

Tanaman Mimba (*Azadirachta indica* Juss), secara empiris telah dikenal oleh masyarakat sebagai salah satu obat tradisional yang dapat mengatasi berbagai macam penyakit, seperti: cacangan, kudis, malaria, infeksi jamur dan alergi. Fenomena ini menunjukkan bahwa mimba mengandung komponen imunomodulator yang dapat memodulasi respon imun. Penelitian dilakukan pada mencit yang diinduksi alergi setelah diberi ekstrak daun mimba (Roitt *et al.*, 1994; Galli *et al.*, 1999). Penggunaan ekstrak alkohol daun mimba (menggambil sari daun mimba) dalam penelitian ini dimaksudkan agar komponen *galic acid*, *catechin*, *epicatechin* tetap berada dalam ekstrak. Jika digunakan perasan daun mimba, maka komponen dari daun mimba tersebut di atas akan hilang.

Ovalbumin (OVA) merupakan protein utama yang berasal dari putih telur berupa glikoprotein dengan besar molekul 45.000 dalton. Molekulnya terdiri dari polipeptida dengan dua atau lebih gugus fosfat dengan rantai manosa dan residu glikosamin (Kang *et al.*, 1999). Sensitivitas dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah Th2. Hal tersebut telah dibuktikan pada banyak penelitian. Kang *et al.* (1999), membuktikan bahwa dengan pemberian ovalbumin secara oral dengan dosis 2,5-250 mg pada mencit jantan selama 4 minggu menyebabkan terjadinya toleransi respon imun mencit bertahan ke arah Th2 dominan setelah 26 minggu meskipun respon imun terhadap Th1 juga terbentuk. Hal tersebut juga dibuktikan oleh Morokata *et al.* (2000), dimana mencit yang disensitisasi dengan OVA dosis tinggi (lebih dari 50 mikrogram) akan menyebabkan timbulnya sitokin Th2 yang ditandai meningkatnya IL-4, IL-5 dan menurunnya IFN- $\gamma$ .

Penelitian ini menggunakan sel limfosit dikarenakan jika alergen masuk ke dalam tubuh, maka sel limfosit yang paling berperan. Sel limfosit tersebut melawan alergen yang masuk dengan cara meningkatkan jumlah sel limfosit. Mukosa mencit yang diinduksi ovalbumin dan diberi ekstrak alkohol daun mimba diharapkan sel limfositnya akan turun.

## **2.7 Hipotesis**

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah terdapat penurunan jumlah limfosit hapusan darah dari mukosa mencit yang diinduksi ovalbumin dan diberi ekstrak alkohol daun mimba.

## **BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pembuatan ekstrak mimba dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Jember.

#### 3.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai bulan Oktober 2011.

### **3.3 Alat dan Bahan**

#### 3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : kandang mencit, gunting bedah untuk dekaputasi, *disposable syringe* untuk alat penyondean dan untuk injeksi, mikroskop cahaya untuk pengamatan hasil penelitian.

#### 3.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : mencit, makanan standart untuk mencit BALB/c pakan ternak turbo, daun mimba, alkohol 70%, ovalbumin sebagai alergen, cat giemsa untuk pembuatan sediaan hapusan darah, aquades steril, air, eter untuk pembiusan mencit saat dekaputasi, kapas, minyak emersi untuk pengamatan hapusan darah.

### **3.4 Definisi Operasional**

#### **3.4.1 Ekstrak alkohol Daun Mimba**

Ekstrak daun Mimba adalah ekstrak daun Mimba yang diperoleh dari daun Mimba lalu diekstraksi dengan menggunakan pelarut alkohol. Ekstrak alkohol daun mimba tersebut diberikan pada mencit dengan menggunakan sonde lambung sebesar 1 ml (Purwanti, 2009)

#### **3.4.2 Ovalbumin**

Alergen yang digunakan adalah ovalbumin. Ovalbumin merupakan alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi (Sugimoto *et al.*, 1999). Ovalbumin sebagai bahan yang sering dipakai pada banyak penelitian untuk mengarahkan respon imun seluler ke arah Th2 dominan dapat diberikan secara inhalasi, oral, maupun intra peritoneal. Sensitisasi dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral, maupun intra peritoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit kearah Th2 (Kang *et al.*, 1999; Akiyana *et al.*, 2001; Saloga *et al.*, 1993). Ovalbumin tersebut dilarutkan dalam PBS, lalu diinjeksi secara intradermal pada mukosa mulut mencit dengan dosis 1 ml.

#### **3.4.3 Jumlah Limfosit**

Penghitungan jumlah limfosit dengan membuat hapusan darah tepi dan dilihat dengan pewarnaan Giemsa. Karena gambaran morfologi limfosit yaitu mempunyai 1 inti, berbentuk bulat dengan kromatin yang rapat paling mudah dikenali adalah dengan menggunakan pengecatan Giemsa (Nurhayati, 2003). Jumlah limfosit dihitung dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dari 100 leukosit.

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun Mimba.

#### **3.5.2. Variabel terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah limfosit.

### 3.5.3. Variabel terkontrol

- a. Makanan mencit.
- b. Jenis kelamin mencit.
- c. Berat badan dan umur mencit.
- d. Dosis dan teknik pemberian ekstrak daun mimba.
- e. Waktu pengambilan sampel.
- f. Prosedur penelitian.
- g. Cara pemeliharaan hewan coba.

## 3.6 Sampel

### 3.6.1 Populasi Penelitian

Populasi sampel dan subyek penelitian adalah mencit dewasa muda jantan berumur 6-12 minggu, sebab mencit pada umur 6-12 minggu dilaporkan dapat menimbulkan reaksi alergi. Apabila mencit tersebut diinjeksi ovalbumin. Penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini perlu dilakukan karena hormon estrogen, progesteron dan testoteron dapat mempengaruhi respon imunitas. Pada mencit yang berumur 7 minggu telah terjadi stadium ovulasi yang waktunya berbeda antar mencit yang satu dengan mencit yang lain sehingga rasio kadar estrogen dan progesterone pada tiap mencit berbeda-beda. Oleh karena itu pada penelitian ini dipilih mencit dengan kelamin jantan.

### 3.6.2 Sampel Penelitian

#### a. Kriteria sampel

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Dalam keadaan sehat.
2. Mencit dengan jenis kelamin jantan

#### b. Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

$n$  = Jumlah sampel penelitian

$\sigma$  = Standart deviasi

$d$  = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi, diasumsikan  $d = \sigma$

$Z$  = Konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0,05$  maka  $Z = 1,9$

(Daniel, 2005)

Perhitungan

$$\begin{aligned} n &= \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2} \text{ dengan asumsi } d = \sigma, \text{ maka } n = Z^2 \\ &= (1,96)^2 \\ &= (3,84) \\ &= 4 \end{aligned}$$

Jumlah sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 sampel untuk sampel masing-masing kelompok. Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit sebagai sampel, yang terbagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 mencit.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Tahap Persiapan

Tahap penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut.

- a. Mencit diadaptasikan terhadap lingkungan kandang di Laboratorium Biomedik FKG Universitas Jember selama 7 hari. Hal ini bertujuan untuk memperoleh keseragaman dalam melakukan penelitian. Mencit diberi makanan standart dan aquades steril untuk minumannya secara *ad libitum* (sesukanya).
- b. Mencit ditimbang sebelum dan sesudah proses adaptasi untuk mengetahui bahwa hewan coba telah beradaptasi dengan baik.

#### 3.7.2 Tahap Pembuatan Ekstrak Alkohol Daun Mimba

Pelarut yang digunakan adalah alkohol 70%, karena pelarut untuk ekstraksi sesuai dengan persyaratan antara lain mudah dipisahkan dari substansi yang

diekstrak, tidak mengadakan reaksi kimia yang tidak diinginkan dengan substansi yang diekstrak, tidak toksik (Susilowati,2000). Cara pembuatannya, daun basah diblender dengan mencampurkan nitrogen cair. Selanjutnya, diberi pelarut alkohol 70 % sebanyak 7 kali berat mimba, setelah itu disaring untuk diambil filtratnya. Filtrate dioven untuk menghilangkan alkohol dan untuk melarutkan zat yang bersifat asam, sehingga komponen *galic acid*, *catechin*, *epicatchin* tetap berada dalam ekstrak.

### 3.7.3 Tahap Pengelompokan dan Perlakuan Sampel

Mencit diperoleh dari Fakultas Biokimia Airlangga Surabaya. Sebelum dikelompokkan sesuai perlakuan, mencit diadaptasi selama seminggu. Sebelum penelitian dilakukan, telah diajukan ke komisi etik (*Animal Care and Use Comite*). Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok yang terbagi menjadi Kelompok kontrol (KO) yang tidak diberi perlakuan, kelompok perlakuan yang terdiri dari : KP<sub>1</sub> yang diinjeksi ovalbumin di mukosa mulut 1 ml, KP<sub>2</sub> yang diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba konsentrasi 50mg/hari/bb, KP<sub>3</sub> yangdiberi konsumsi ekstrak cair daun mimba konsentrasi 100mg/hari/bb, KP<sub>4</sub> yang diberi konsumsi ekstrak cair daun mimba konsentrasi 200mg/hari/bb. Pada KP<sub>2</sub>, KP<sub>3</sub> dan KP<sub>4</sub> setelah hari ke 21 diinjeksi ovalbumin di mukosa mulut 1 ml.

### 3.7.4 Pemberian Ekstrak Alkohol Daun Mimba pada Mencit

Ekstrak cair daun mimba diberikan pada mencit menggunakan sonde lambung dengan dosis 50 mg/kg/hari, 100 mg/kg/hari, 200mg/kg/hari sebanyak 1 ml dan diberikan pada jam yang sama (jam 10.00).

### 3.7.5 Injeksi Ovalbumin

Injeksi ovalbumin dilakuan menggunakan *disposable syringe* secara intradermal di mukosa mulut mencit 1 ml.

### 3.7.6 Pemeriksaan Jumlah Limfosit

Pemeriksaan limfosit dilakukan dengan memakai hitung jenis leukosit (*differential counting leukocyte*) dengan pewarnaan giemsa. Pada hitung jenis leukosit, limfosit dihitung per 100 leukosit.

### 3.7.7 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah (diambil dari mukosa mulut mencit)

Pembuatan sediaan hapusan darah dilakukan dengan menyediakan kaca obyek yang kering, bebas dari debu dan bebas lemak. Untuk kaca obyek tersebut dengan menggeserkan darah pada kaca obyek dipakai kaca obyek yang lain yang sisi pendeknya rata sekali. Menyentuhnya tanpa menyentuh kulit setetes darah kecil (garis tengah tidak melebihi 2 mm) dengan kaca obyek, kira-kira 2 cm dari ujungnya dan letakkan kaca itu diatas meja dengan tetes darah di sebelah kanan. Dengan tangan kanan, letakkan kaca obyek yang lain di sebelah kiri tetes darah tadi dan digerakkan ke kanan hingga mengenai tetes darah. Tetes darah akan menyebar pada sisi kaca penggeser itu. Tunggulah sampai darah itu mencapai titik kira-kira 0,5 cm dari sudu kaca penggeser. Segeralah geserkan kaca itu ke kiri sambil memegangnya miring dengan sudut antara 30-45 derajat. Janganlah menekan kaca penggeser itu ke bawah. Kaca penghapusn itu didorong sehingga terbentuk hapusan darah sepanjang 3-4 cm pada kaca obyek. Darah harus habis sebelum kaca penghapus mencapai ujung dari obyek, hapusan darah tidak terlalu tipis atau tebal. Biarkan sediaan kering di udara, dan yang terakhir memberi label pada preparat.

### 3.7.8 Pewarnaan Sediaan Hapusan Darah

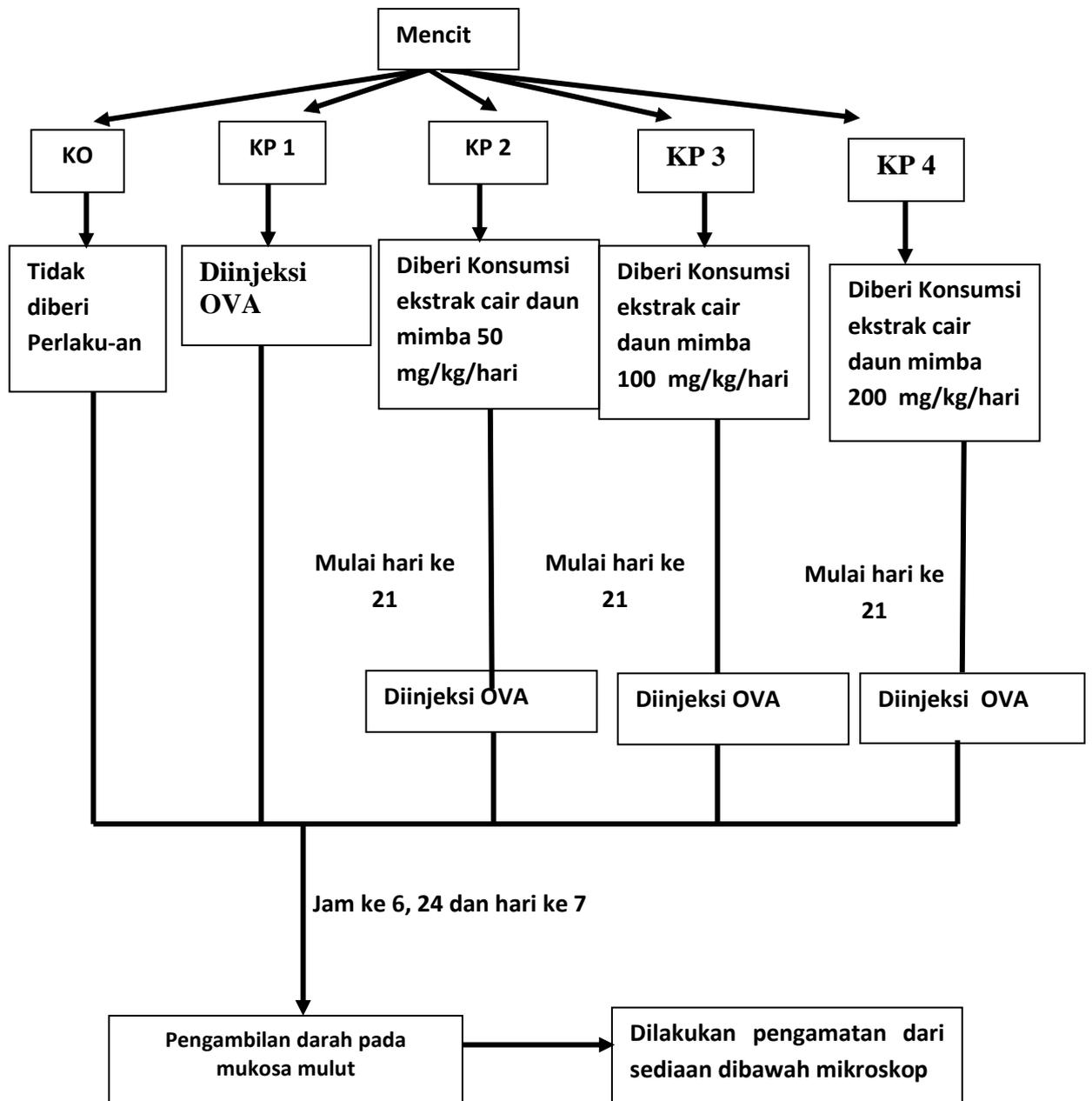
Pewarnaan sediaan darah dilakukan dengan meletakkan sediaan yang akan dipulas diatas rak tempat memulas dengan lapisan darah ke atas. Ditetesi sekian banyak metil alkohol keatas sediaan, sehingga bagian yang terlapis dan tertutup seluruhnya. Biarkan selama 5 menit atau lebih lama. Menuangkan kelebihan metil alkohol dari kaca. Pengecatan sediaan itu dengan giemsa yang telah diencerkan

dengan larutan penyanggah dan biarkan selama 20 menit. Kemudian dibilas dengan air suling.

### 3.8 Analisis Statistik

Berdasarkan perhitungan jumlah limfosit dari keempat perlakuan diatas dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* ( $p > 0,05$ ) untuk mengetahui apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak, kemudian data tersebut dilanjutkan uji *homogeneity of variances* ( $p > 0,05$ ) untuk mengetahui apakah data tersebut homogen atau tidak. Uji statistik parametrik yang dilakukan adalah uji ANOVA dua arah (*Two Way ANOVA*) dengan derajat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ). Jika hasil yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*). Apabila pada uji homogenitas menunjukkan bahwa data yang diperoleh tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik Kruskal Wallis dengan derajat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ). Bila ada perbedaan yang nyata diantara kelompok sampel, dilanjutkan dengan uji statistik Mann-Whitney dengan derajat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3.9 Alur Penelitian



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian terhadap jumlah limfosit mencit BALB-C yang diberi ekstrak alkohol daun mimba (*Azadirachta indica* Juzz) dan diinduksi ovalbumin. Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 20 ekor mencit dan dibagi 5 kelompok yaitu kelompok perlakuan sebanyak 16 ekor dan kelompok kontrol sebanyak 4 ekor. Kelompok perlakuan dibagi menjadi KP<sub>1</sub>, KP<sub>2</sub>, KP<sub>3</sub>, dan KP<sub>4</sub>, tiap kelompok tersebut terdiri 4 ekor mencit. KP<sub>1</sub> hanya diinjeksi ovalbumin, sedangkan KP<sub>2</sub> sampai KP<sub>4</sub> diberi ekstrak alkohol daun mimba 50 mg/kg/hari, 100 mg/kg/hari, 200 mg/kg/hari dan diinjeksi ovalbumin. Sedangkan kelompok kontrol mencit tidak diberi perlakuan.

Tabel 4.1 Hasil Penghitungan Rata-Rata Jumlah Sel Limfosit pada Mencit yang Diberi Ekstrak Alkohol Daun Mimba (*Azadirachta indica*) dan Diinduksi Ovalbumin Selama 21 hari.

Perlakuan Mencit	Jumlah Sampel	KO	KP <sub>1</sub>	KP <sub>2</sub>	KP <sub>3</sub>	KP <sub>4</sub>
Jam ke 6	4	80	166	61	44	37
Jam ke 24	4	197	222	201	243	193
Hari ke 7	4	218	257	215	113	238

KO : Tidak diberi perlakuan

KP<sub>1</sub> : Diinjeksi Ovalbumin

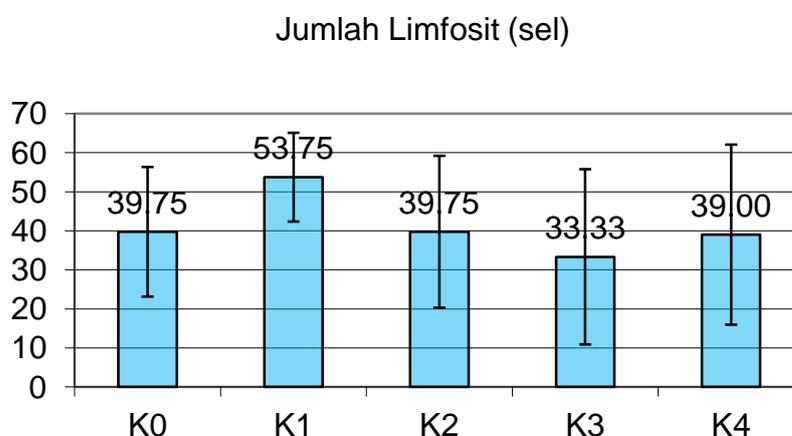
KP<sub>2</sub> : Diberi konsumsi ekstrak alkohol daun mimba 50 mg/hari dan diinjeksi ovalbumin

KP<sub>3</sub> : Diberi konsumsi ekstrak alkohol daun mimba 100 mg/hari dan diinjeksi ovalbumin

KP<sub>4</sub> : Diberi konsumsi ekstrak alkohol daun mimba 200 mg/hari dan diinjeksi ovalbumin

Pada Tabel 4.1 terlihat jumlah limfosit pada kelima kelompok mencit terdapat perbedaan pada pengambilan sampel jam ke 6, jam ke 24, dan hari ke 7. Perbedaan tersebut terlihat dari mencit yang diberi perlakuan dengan mencit yang tidak diberi perlakuan. Bahwa jumlah limfosit yang diberi ekstrak daun mimba terlebih dahulu lalu diinjeksi alergen, jumlah limfosit menurun dibandingkan yang langsung diinjeksi alergen.

Kelompok yang memiliki jumlah limfosit tertinggi sampai terendah pada kelompok 1 yang hanya diberi ovalbumin, kelompok kontrol yang tidak diberi ovalbumin dan tidak diberi ekstrak daun mimba. Kelompok perlakuan 2 yang diberi ovalbumin dan diberi ekstrak daun mimba 50 mg, kelompok perlakuan 3 yang diberi ovalbumin dan diberi ekstrak daun mimba 100 mg, dan kelompok perlakuan 4 yang diberi ovalbumin dan diberi ekstrak daun mimba 200 mg. Lalu hapusan darah diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x.



Gambar 4.1 Diagram Batang Jumlah Hasil Penghitungan Sel Limfosit pada Mencit yang Diberi Ekstrak Alkohol Daun Mimba (*Aradirachta indica*) dan Diinduksi Ovalbumin Selama 21 hari.

KO : Tidak diberi perlakuan

KP1 : Diinjeksi Ovalbumin

KP2 : Diberi konsumsi ekstrak alkohol daun mimba 50 mg/hari dan diinjeksi ovalbumin

KP3 : Diberi konsumsi ekstrak alkohol daun mimba 100 mg/hari dan diinjeksi ovalbumin

KP4 : Diberi konsumsi ekstrak alkohol daun mimba 200 mg/hari dan diinjeksi ovalbumin

Pada Gambar 4.1 terlihat jumlah limfosit yang tertinggi pada KP<sub>1</sub>, dimana mencit hanya diberi alergen ovalbumin tanpa diberi ekstrak daun mimba dengan jumlah limfosit pada KP<sub>1</sub> adalah 53,75 sel. Pada KO merupakan kelompok kontrol yaitu tidak diberi perlakuan injeksi ovalbumin dan tidak diberi ekstrak daun mimba, dengan jumlah limfosit 39,75 sel. Sedangkan pada KP<sub>2</sub> yang diberi konsumsi ekstrak daun mimba konsentrasi 50 mg/kg/hari, kemudian pada hari ke 21 mulai diinjeksi alergen ovalbumin pada submukosa memiliki jumlah limfosit

39,75 sel. KP<sub>3</sub> diberi konsumsi ekstrak daun mimba konsentrasi 100 mg/kg/hari, kemudian pada hari ke 21 mulai diinjeksi alergen ovalbumin pada submukosa memiliki jumlah limfosit 33,33 sel. KP<sub>4</sub> diberi konsumsi ekstrak daun mimba konsentrasi 200 mg/kg/hari, kemudian pada hari ke 21 mulai diinjeksi alergen ovalbumin pada submukosa memiliki jumlah limfosit 39,00 sel. Dari grafik diatas terlihat bahwa pada KP<sub>3</sub> jumlah limfosit menurun, yaitu mencit diinjeksi alergen yang sebelumnya diberi ekstrak daun mimba 100 mg/hari/bb. Hal ini membuktikan bahwa besarnya perbedaan pemberian jumlah dosis yang kecil tidak berpengaruh pada jumlah limfosit.

#### 4.2 Analisis Data

Dari hasil penelitian yang didapatkan dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan tes homogenitas menggunakan Lavene. Hasil uji normalitas menunjukkan  $p=0,995(p>0,05)$  yang berarti data bahwa data berdistribusi normal dan hasil uji homogenitas menunjukkan data  $p=0,772(p>0,05)$  yang berarti data homogen. Kemudian hasil penelitian dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan uji ANOVA dua arah (*two way anova*) dengan derajat kemaknaan 95% ( $p<0,05$ ). Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, yaitu  $p= 0,000$  yang berarti ada perbedaan yang signifikan antara rata-rata kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Selanjutnya untuk lebih menegaskan hasil uji *two way anova* dan mengetahui kelompok apa saja yang menunjukkan hasil yang signifikan dilakukan uji beda Tukey HSD, diperoleh hasil  $p=0,746(p>0,05)$  yang berarti antara kelima kelompok tersebut tidak ada perbedaan yang signifikan.

#### 4.3 Pembahasan

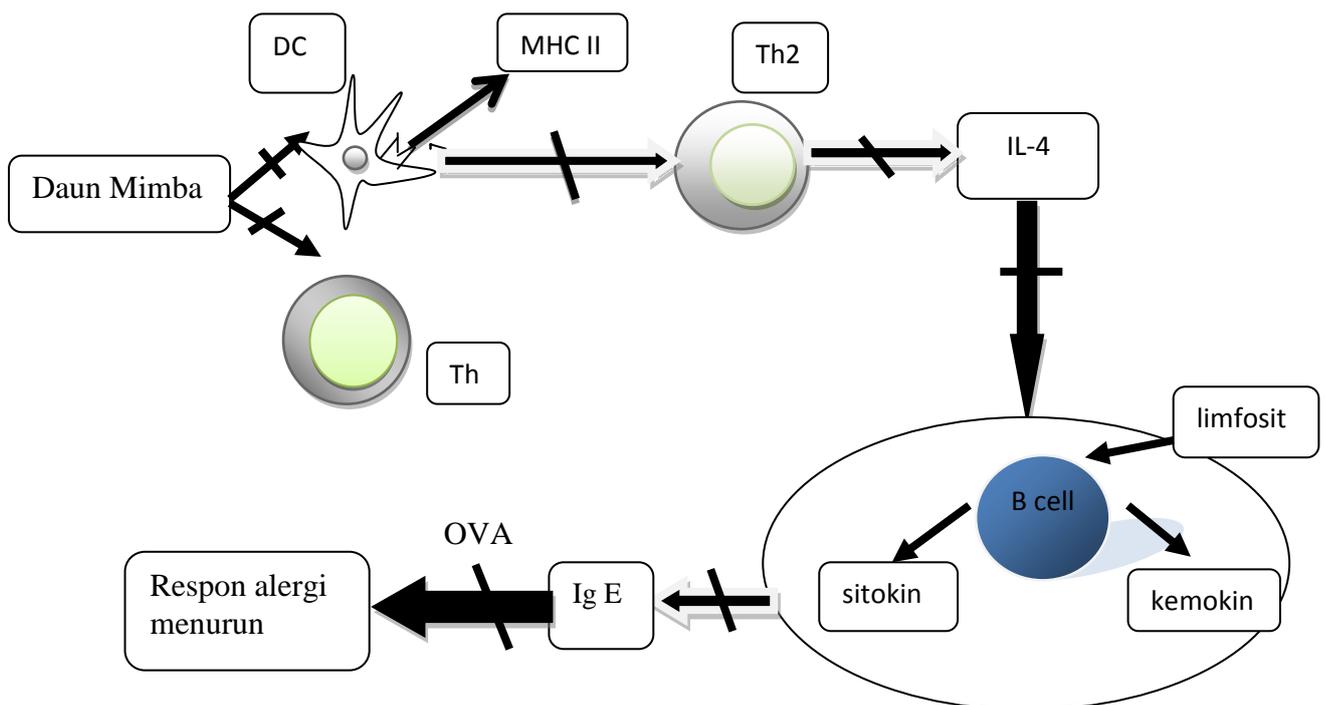
Berdasarkan hasil dari penelitian jumlah limfosit pada kelima kelompok penelitian dapat dilihat dari tiap kelompok terjadi penurunan jumlah limfosit hapusan darah dari mukosa mencit yang diinduksi ovalbumin dan diberi ekstrak alkohol daun mimba. Saat pengambilan jam ke 6, jam ke 24 dan hari ke 7. Jumlah limfosit meningkat pada hari ke 7 dikarenakan masa hidup limfosit dalam

sirkulasi yaitu masa hidupnya dapat berbulan-bulan karena siklus hidup limfosit untuk kemudian masuk ke dalam jaringan (Irani, 2002). Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa ovalbumin yang diberikan pada mencit subset sel T akan bergerak ke arah Th2, di sisi lain juga ditandai dengan meningkatnya IL-4 yang dapat meningkatkan produksi limfosit.

Penurunan ini dapat distimulasi oleh adanya daun mimba. Pada penderita alergi biasanya sel T akan berkembang ke arah Th2 dominan. Sel T ke arah Th2 dominan ditandai dari meningkatnya IL-4, IL-5, IL-10. Dan perkembangan sel T regenerasi ditandai dari meningkatnya CD-4 dan CD-5 kemudian menghasilkan IL-10. IL-4 yang diproduksi Th2 (B cell) akan bertindak sebagai sitokin yang menginduksi aktivasi dan diferensiasi sel. Sehingga memacu produksi IgE yang banyak terjadi pada penderita alergi. Kehadiran antigen transmukosa pada level yang sangat rendah merupakan cara yang sangat efisien menginduksi respon IgE yang dipacu oleh Th2. Produksi antibodi IgE memerlukan bantuan Th2 yang mensekresi IL-4 dan IL-13. Peran Th2 dapat dihambat oleh Th1 yang memproduksi interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Presentasi antigen pada dosis yang sangat rendah akan memungkinkan terjadinya aktivasi Th2 dan tidak menyebabkan aktivasi Th1, dan banyak alergen yang masuk sistem respirasi dengan dosis yang sangat rendah. Daun mimba sendiri telah terbukti dalam berbagai penelitian memiliki potensi daun mimba sebagai imunostimulator yakni meningkatkan derajat imunitas Respon sel T terhadap antigen bersifat sangat spesifik, sama seperti respon antibodi dalam melakukan pertahanan terhadap infeksi. Limfosit akan berespon terhadap antigen hanya bila antigen berikatan dengan molekul spesifik yang dikenal dengan protein MHC pada permukaan sel yang menampilkan antigen (*antigen-presenting cell*) di dalam jaringan limfoid. Tiga tipe *antigen-presenting cell* yang utama adalah makrofag, limfosit B, dan dendritik. Sel dendritik, *antigen-presenting cell* yang paling berpengaruh, ada di seluruh tubuh. Terdapat dua sub tipe utama sel T: sel T pembunuh dan sel T pembantu. Sel T pembunuh hanya mengenali antigen dirangkaikan pada molekul kelas I MHC, sementara sel T pembantu hanya mengenali antigen dirangkaikan pada molekul kelas II MHC. Dua mekanisme penyampaian antigen tersebut

memunculkan peran berbeda dua tipe sel T. Ketiga, subtipe minor adalah sel T  $\gamma\delta$  yang mengenali antigen yang tidak melekat pada reseptor MHC (Guyton and Hall, 2008). Sel B (limfosit) menghasilkan sitokin dan kemokin (seperti terlihat pada Gambar 2.15).

Pada KP<sub>1</sub>, dimana mencit hanya diinjeksi alergen yaitu ovalbumin tanpa diberi konsumsi ekstrak daun mimba membuktikan bahwa jumlah limfosit lebih banyak dibandingkan jumlah limfosit pada KP<sub>2</sub>, KP<sub>3</sub>, dan KP<sub>4</sub> yang diberi ekstrak daun mimba sebelum diinjeksi alergen. Dan K0 yang tidak diberi perlakuan apapun. Dari penelitian yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa ada aktivitas Th2.



Gambar 2.7 Mekanisme penghambatan reaksi alergi oleh daun mimba (Setyani, 2012)

Keterangan:

Terjadi penghambatan = 

## **BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak alkohol daun mimba menurunkan jumlah limfosit pada mukosa mulut mencit yang diinduksi ovalbumin dan diberi konsumsi ekstrak alkohol daun mimba. Namun demikian, besarnya perbedaan pemberian jumlah dosis yang kecil tidak berpengaruh pada jumlah limfosit.

### **5.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan memperbanyak jumlah sampel, menambah waktu perlakuan dan menggunakan hewan coba yang lebih besar, sehingga dapat mengurangi data yang bias dan perubahan sel limfosit dapat terlihat jelas.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas sel-sel limfosit dan mediator kimia yang berperan dalam reaksi alergi selain limfosit
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang jumlah sel limfosit yang diberi ekstrak alkohol daun mimba dilihat dari faktor waktu pengambilan sampel limfosit.

## DAFTAR BACAAN

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*, 4<sup>th</sup> Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia. Pp: 91, 110, 111, 150, 203, 236, 262-263, 276, 277, 303, 332.
- Akiyana H, Teshima R, Sakushima. 2001. JI. Xamination of oral sensization with ovalbumin in Brown Norway rats and thr strains mice. *Immunol Lett* 2001 Aug 1; 78(1):1-5.
- Arivazhagan, S., Balasenthil, S. & Nagini, S. 2000. *Garlic and neem leaf extracts enhance hepatic glutathione and glutathione dependent enzyme during N-methyl-N-nitro-N-nitrosogouaine (MNNG-induced gastric carcinogenesis in rats. Phytotheraphy Research. Pubmed On-line, Juni 2000 14 (4): 291-293.*
- Badam, L., Joshi, S. P. & Bedekar, S. S. 1999. Invitro Antiviral Activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Leaf Exktract Against Group B Cocksackieviruses. *The Journal of Communicable Disease*. 31 (2):79-90.
- Biswas.2002.Biological Activities and Medical Properties of Neem(*Azadirachta Indica*).*Current Science*.82(11): 80-86.
- Cormack, D.H. 1994. *HAM Histologi*. Edisi 9. Alih Bahasa Jan Tambajong. "Ham's Histology". Jakarta: Binarupa Aksara.
- Dang 2003. Kava root (*Piper methysticum*, L.) as a potential natural herbicide and fungicide.*Journal Crop Protection*. 22 (6): 837-881.
- Dewanti Ratna, 2008. Efek Ekstrak Cair Daun Mimba terhadap Fagositosis Makrofag pada Tikus yang Diinokulasi *Candida albicans*. Disertasi. Pascasarjana: Universitas Airlangga, Surabaya.
- Fatima. 2005. In vitro Assessment of Anti-Cutaneous Leishmaniasis Activity of Some Sudanse Plants.*Turkiye Parazitoloji Dergisi* 29 (1):3-6.
- Fornswort, N. R., 1966, Biological and Phytomical Screening of Plant,*J., Pharm. Sci.* 55 (3):225-276.
- Ganguli, S. 2002. Neem : A tharepeutic for All seasons.*Current Science*. 82 (11):73-85.
- Goel, R. K. and Sairam, K. 2002. Anti Ulcer drugs from indigeneous source with emphasis on musa sapientum, tamrabhasma, asparagus racemous and zingiber officinale. *Indian Journal of Pharmacology*.

- Grainage and Salem. 1987. *Handbook of Plant with Pest control Properties*. John Willey and Sons : New York.
- Harsini, Widjojono. 2008. Penggunaan Obat di Bidang Kedokteran Gigi, *Majalah Kedokteran Gigi*.UGM.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., & Kelley, R.O. 1997. *Histologi dasar*. Edisi 8. Alih Bahasa Jan Tambajong. Jakarta: EGC.
- Kang B, Kim KM, Kang CY. 1999. Oral tolerance by high OVA in BALB/C mic is more pronounced and persistent in th2-medited immune responses than th1 responses. *J. Immunobiology*. 200:264-76.
- Kardiman,1999. “*Pestisida Hayati : Ramuan dan Aplikasi*”. Jakarta : Penebar Swadaya
- Kardinan,Agus.Taryoto.2003.*Tanaman Obat Penggempur Kanker*.Edisi 9.Jakarta:EGC.
- Leeson, C. Roland, Thomas S. Lesson and Anthony A Paparo. 1996. *Buku Ajar Histologi*. Penerjemah S. Koesparto Siswojo dkk, Penyunting Jan Tambajong and Sugito W. Judul asli: *Textbook of Histologi*. Jakarta: EGC.
- Morokata T, Ishikawa J, Yamada T. 2000. Antigen dose definies T helper and T helpe 2 responses in the lungs of C57BL/6 and BALB/c mice independently of splenic responses, *Immunol Lett*. 72 (2) :119-26.
- Mirin, 1997. Pengujian Kemampuan Beberapa pengisida nabati untuk Pengendalian Penyakit Layu Furasium pada Tomat. *Jurnal Agrista1* (2) Universitas Syah Kuala.
- Price, S.A and Wilson. 1995. “Clinical Consept of Discase Processes (1994)”. Terjemahan Peter Augerah. *Patofisiologi Konsep Klinik Proses-proses Penyakit*. Edisi 2. Bagian 1. Jakarta: EGC.
- Purwanti, D. 2009, Efek Ekstrak Daun Mimba Terhadap Jumlah Koloni Candida albicans pada Kasus Kandidiasis Vaginalis Tikus Rattus Novergicus.Tesis, Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Ray, Barnejee B. D. 1996 Modulation of Humoral and cell-mediated immune responses by *Azadirachta indica* (Neem) in Mice.*Indian Jurnal Exp biology*. 34 (7): 77-82.
- Rembold, H. 1989. *Azadirzchtin : Their Structure and Mode of Action*, p.150-163. In J.T. Arnason, B.J.R.
- Ruskin FR editor (1993).*Neem: A tree for solving global problems*. Report of an adhoc panel of the board on Science and Technology for International Development: National Research Council. National Academy Press (2<sup>nd</sup> Printing) Washington DC.

- Roitt I. Essential immunology. 8<sup>th</sup>eds. Oxford. Blackwell Science Ltd. 1994 : 312-36.
- Saloga, J., Reinz, H., Leg Lack, G. 1993. Development and transfer of immediate cutaneous hypersensitivity in mice exposed to aerosolized antigen. *Z clean. Invest.* 91:13-40.
- Sastrodiharjo, S. 1998. *Evaluasi Daya Insektisida dari Ekstrak Daun Mimba (Azadirachta indica A. Juss)*. Seminar Hasil Penelitian Pangan dan Gizi. Ilmu Hayati : Jakarta.
- Schmutterer, H. (ed.) 1995. *The Neem Tree : source of unique natural product for integrated pest management, medicine, industry and other purpose*. VCH, Weinheim, 696 p.
- Senrayan, R. 1997. *Prospect and Challenges in Production of Pesticides with Use of Neem*. 24-25 November 1997. Surabaya-Indonesia.
- Sudarmadji, S., 1999. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Edisi Pertama. Liberty. Yogyakarta
- Sukrasno. 2003. *Mimba Tanaman Obat Multifungsi*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Talwar, Shah S, Mukherjee S, Chabra R, 1997 Jun. Induced termination of pregnancy by purified extracts of Azadirachta Indica (Neem): mechanism involved. *Am J Reprod Immunol.*; 37(6):485-91.
- Upadhayay, Dhawan S., Garg, S.; Talwar. 1992. Immunomodulation Effect of Neem (Azadirachta indica) oil. *International Journal of Immunopharmacology*. 14 (7): 78-84.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta. Universitas Gajah Mada University Press.

## Lampiran A. Data Pengukuran Jumlah Limfosit

### Jam ke 7

KO	KP1	KP2	KP3	KP4
20	48	14	17	8
27	45	11	14	8
20	42	14	7	9
13	31	22	6	12

### Jam ke 24

KO	KP1	KP2	KP3	KP4
50	51	55	66	43
59	54	46	70	46
39	64	55	57	59
49	53	45	50	45

### Hari ke 7

KO	KP1	KP2	KP3	KP4
44	58	66	34	52
40	65	55	28	66
50	62	55	21	62
66	72	39	30	58

## Lampiran B. Analisa Data Penelitian

### B.1 Uji Kolmogorov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah Limfosit
N		60
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	41.1167
	Std. Deviation	19.62106
Most Extreme Differences	Absolute	.128
	Positive	.102
	Negative	-.128
Kolmogorov-Smirnov Z		.995
Asymp. Sig. (2-tailed)		.275

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## B.2 Uji Homogenitas Levene

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

Perlakuan	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
K0	Jam ke-6	20.0000	5.71548	4
	Jam ke-24	49.2500	8.18026	4
	Hari ke-7	50.0000	11.43095	4
	Total	39.7500	16.60298	12
K1	Jam ke-6	41.5000	7.41620	4
	Jam ke-24	55.5000	5.80230	4
	Hari ke-7	64.2500	5.90903	4
	Total	53.7500	11.37881	12
K2	Jam ke-6	15.2500	4.71699	4
	Jam ke-24	50.2500	5.50000	4
	Hari ke-7	53.7500	11.11680	4
	Total	39.7500	19.43345	12
K3	Jam ke-6	11.0000	5.35413	4
	Jam ke-24	60.7500	8.99537	4
	Hari ke-7	28.2500	5.43906	4
	Total	33.3333	22.40671	12
K4	Jam ke-6	9.2500	1.89297	4
	Jam ke-24	48.2500	7.27438	4
	Hari ke-7	59.5000	5.97216	4
	Total	39.0000	23.04146	12
Total	Jam ke-6	19.4000	12.86529	20
	Jam ke-24	52.8000	8.06291	20
	Hari ke-7	51.1500	14.79429	20
	Total	41.1167	19.62106	60

### Levene's Test of Equality of Error Variances

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

F	df1	df2	Sig.
.742	14	45	.722

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+X7+X8+X7 \* X8

### B.3 Analisis *Two Way Anova*

Hasil Uji *Two Way Anova* terhadap rerata jumlah limfosit mencit pada kelima kelompok perlakuan dan perbedaan waktu pengambilan sampel jam ke-6, 24 dan hari ke 7.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20430.433 <sup>a</sup>	14	1459.317	28.755	.000
Intercept	101434.817	1	101434.817	1998.716	.000
X7	2740.767	4	685.192	13.501	.000
X8	14175.633	2	7087.817	139.661	.000
X7 * X8	3514.033	8	439.254	8.655	.000
Error	2283.750	45	50.750		
Total	124149.000	60			
Corrected Total	22714.183	59			

a. R Squared = .899 (Adjusted R Squared = .868)

### B.4 Uji Benda Tukey HSD Perlakuan

Signifikansi uji beda Tukey HSD terhadap rerata jumlah limfosit pada kelima kelompok perlakuan.

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Limfosit  
Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K0	K1	-14.0000*	2.90832	.000	-22.2638	-5.7362
	K2	.0000	2.90832	1.000	-8.2638	8.2638
	K3	6.4167	2.90832	.196	-1.8472	14.6805
	K4	.7500	2.90832	.999	-7.5138	9.0138
K1	K0	14.0000*	2.90832	.000	5.7362	22.2638
	K2	14.0000*	2.90832	.000	5.7362	22.2638
	K3	20.4167*	2.90832	.000	12.1528	28.6805
	K4	14.7500*	2.90832	.000	6.4862	23.0138
K2	K0	.0000	2.90832	1.000	-8.2638	8.2638
	K1	-14.0000*	2.90832	.000	-22.2638	-5.7362
	K3	6.4167	2.90832	.196	-1.8472	14.6805
	K4	.7500	2.90832	.999	-7.5138	9.0138
K3	K0	-6.4167	2.90832	.196	-14.6805	1.8472
	K1	-20.4167*	2.90832	.000	-28.6805	-12.1528
	K2	-6.4167	2.90832	.196	-14.6805	1.8472
	K4	-5.6667	2.90832	.308	-13.9305	2.5972
K4	K0	-.7500	2.90832	.999	-9.0138	7.5138
	K1	-14.7500*	2.90832	.000	-23.0138	-6.4862
	K2	-.7500	2.90832	.999	-9.0138	7.5138
	K3	5.6667	2.90832	.308	-2.5972	13.9305

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Homogeneous Subsets

#### Jumlah Limfosit

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
K3	12	33.3333	
K4	12	39.0000	
K2	12	39.7500	
K0	12	39.7500	
K1	12		53.7500
Sig.		.196	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 50.750.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b. Alpha = .05.

### B.6 Uji Beda HSD Waktu

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

Tukey HSD

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Jam ke-6	Jam ke-24	-33.4000*	2.25278	.000	-38.8599	-27.9401
	Hari ke-7	-31.7500*	2.25278	.000	-37.2099	-26.2901
Jam ke-24	Jam ke-6	33.4000*	2.25278	.000	27.9401	38.8599
	Hari ke-7	1.6500	2.25278	.746	-3.8099	7.1099
Hari ke-7	Jam ke-6	31.7500*	2.25278	.000	26.2901	37.2099
	Jam ke-24	-1.6500	2.25278	.746	-7.1099	3.8099

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

## Jumlah Limfosit

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Waktu	N	Subset	
		1	2
Jam ke-6	20	19.4000	
Hari ke-7	20		51.1500
Jam ke-24	20		52.8000
Sig.		1.000	.746

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 50.750.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

b. Alpha = .05.

## Lampiran C. Gambar Alat dan Bahan Penelitian.

## C.1 Gambar Alat perlakuan hewan coba



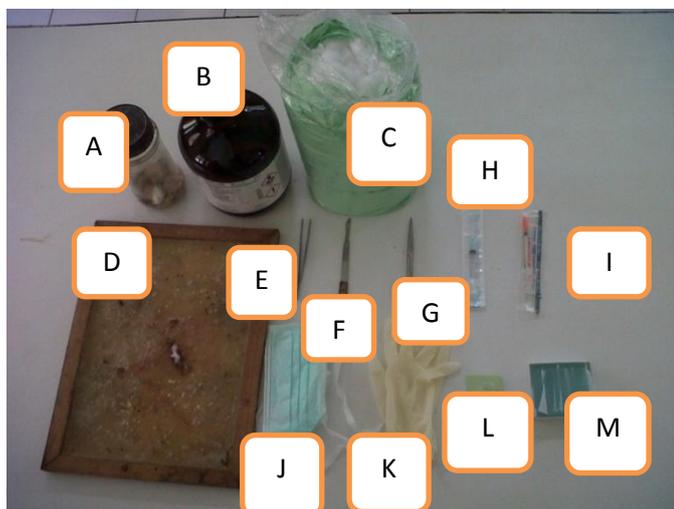
- A. Kandang hewan coba.
- B. Neraca Ohaus.
- C. Sonde lambung.
- D. Sarung tangan.
- E. Masker.

### C.2 Gambar Alat untuk Membuat Ekstrak Mimba.

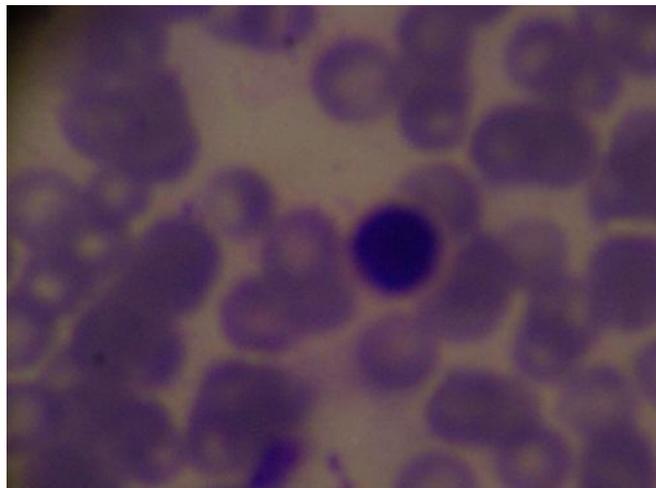


- |                          |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| A. Tabung nitrogen cair. | E. Mesin pengering.     |
| B. Blender.              | F. Alat sentrifuse.     |
| C. Timbangan digital.    | G. Tabung reaksi kecil. |
| D. Baki plastic.         |                         |

### C.3 Gambar Alat untuk Dekaputasi dan Pengambilan Sampel.



- |                            |                    |
|----------------------------|--------------------|
| A. Toples paraffin.        | H. Syringe.        |
| B. Eter.                   | I. Syringe 2.      |
| C. Kertas.                 | J. Masker.         |
| D. Papan paraffin.         | K. Sarung tangan.  |
| E. Pinset surgis.          | L. Botol specimen. |
| F. Scalpel dan mata pisau. | M. Obyek glas.     |
| G. Gunting bedah.          |                    |

**C.4 Gambar Perlakuan Hewan Coba.****Gambar 1. Perlakuan Pemberian Ekstrak Alkohol Daun Mimba.****Gambar 2. Perlakuan Induksi Ovalbumin.****C.5 Gambar Pemeriksaan Limfosit.**

### Lampiran A. Data Pengukuran Jumlah Limfosit

#### Jam ke 7

KO	KP1	KP2	KP3	KP4
20	48	14	17	8
27	45	11	14	8
20	42	14	7	9
13	31	22	6	12

#### Jam ke 24

KO	KP1	KP2	KP3	KP4
50	51	55	66	43
59	54	46	70	46
39	64	55	57	59
49	53	45	50	45

#### Hari ke 7

KO	KP1	KP2	KP3	KP4
44	58	66	34	52
40	65	55	28	66
50	62	55	21	62
66	72	39	30	58

### Lampiran B. Analisa Data Penelitian

#### B.1 Uji Kolmogorov-Smirnov

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah Limfosit
N		60
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	41.1167
	Std. Deviation	19.62106
Most Extreme Differences	Absolute	.128
	Positive	.102
	Negative	-.128
Kolmogorov-Smirnov Z		.995
Asymp. Sig. (2-tailed)		.275

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## B.2 Uji Homogenitas Levene

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

Perlakuan	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
K0	Jam ke-6	20.0000	5.71548	4
	Jam ke-24	49.2500	8.18026	4
	Hari ke-7	50.0000	11.43095	4
	Total	39.7500	16.60298	12
K1	Jam ke-6	41.5000	7.41620	4
	Jam ke-24	55.5000	5.80230	4
	Hari ke-7	64.2500	5.90903	4
	Total	53.7500	11.37881	12
K2	Jam ke-6	15.2500	4.71699	4
	Jam ke-24	50.2500	5.50000	4
	Hari ke-7	53.7500	11.11680	4
	Total	39.7500	19.43345	12
K3	Jam ke-6	11.0000	5.35413	4
	Jam ke-24	60.7500	8.99537	4
	Hari ke-7	28.2500	5.43906	4
	Total	33.3333	22.40671	12
K4	Jam ke-6	9.2500	1.89297	4
	Jam ke-24	48.2500	7.27438	4
	Hari ke-7	59.5000	5.97216	4
	Total	39.0000	23.04146	12
Total	Jam ke-6	19.4000	12.86529	20
	Jam ke-24	52.8000	8.06291	20
	Hari ke-7	51.1500	14.79429	20
	Total	41.1167	19.62106	60

### Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

F	df1	df2	Sig.
.742	14	45	.722

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+X7+X8+X7 \* X8

### B.3 Analisis *Two Way Anova*

Hasil Uji *Two Way Anova* terhadap rerata jumlah limfosit mencit pada kelima kelompok perlakuan dan perbedaan waktu pengambilan sampel jam ke-6, 24 dan hari ke 7.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	20430.433 <sup>a</sup>	14	1459.317	28.755	.000
Intercept	101434.817	1	101434.817	1998.716	.000
X7	2740.767	4	685.192	13.501	.000
X8	14175.633	2	7087.817	139.661	.000
X7 * X8	3514.033	8	439.254	8.655	.000
Error	2283.750	45	50.750		
Total	124149.000	60			
Corrected Total	22714.183	59			

a. R Squared = .899 (Adjusted R Squared = .868)

### B.4 Uji Beda Tukey HSD Perlakuan

Signifikansi uji beda Tukey HSD terhadap rerata jumlah limfosit pada kelima kelompok perlakuan.

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K0	<1	-14.0000*	2.90832	.000	-22.2638	-5.7362
	<2	.0000	2.90832	1.000	8.2638	8.2638
	<3	6.4167	2.90832	.196	-1.3472	14.6805
	<4	.7500	2.90832	.999	-7.5138	9.0138
K1	<0	14.0000*	2.90832	.000	5.7362	22.2638
	<2	14.0000*	2.90832	.000	5.7362	22.2638
	<3	20.4167*	2.90832	.000	12.1528	28.6805
	<4	14.7500*	2.90832	.000	6.4862	23.0138
K2	<0	.0000	2.90832	1.000	-8.2638	8.2638
	<1	-14.0000*	2.90832	.000	-22.2638	-5.7362
	<3	6.4167	2.90832	.196	-1.3472	14.6805
	<4	.7500	2.90832	.999	-7.5138	9.0138
K3	<0	-6.4167	2.90832	.196	-14.5805	1.8472
	<1	-20.4167*	2.90832	.000	-28.5805	-12.1528
	<2	-6.4167	2.90832	.196	-14.5805	1.8472
	<4	-5.6667	2.90832	.308	-13.9305	2.5972
K4	<0	-.7500	2.90832	.999	-9.0138	7.5138
	<1	-14.7500*	2.90832	.000	-23.0138	-0.4862
	<2	-.7500	2.90832	.999	-9.0138	7.5138
	<3	5.6667	2.90832	.308	-2.5972	13.9305

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

## Jumlah Limfosit

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
K3	12	33.3333	
K4	12	39.0000	
K2	12	39.7500	
K0	12	39.7500	
K1	12		53.7500
Sig.		.196	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 50.750.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b. Alpha = .05.

## B.6 Uji Beda HSD Waktu

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Limfosit

Tukey HSD

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Jam ke-6	Jam ke-24	-33.4000*	2.25278	.000	-38.8599	-27.9401
	Hari ke-7	-31.7500*	2.25278	.000	-37.2099	-26.2901
Jam ke-24	Jam ke-6	33.4000*	2.25278	.000	27.9401	38.8599
	Hari ke-7	1.6500	2.25278	.746	-3.8099	7.1099
Hari ke-7	Jam ke-6	31.7500*	2.25278	.000	26.2901	37.2099
	Jam ke-24	-1.6500	2.25278	.746	-7.1099	3.8099

Based on observed means.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

## Jumlah Limfosit

Tukey HSD <sup>a,b</sup>

Waktu	N	Subset	
		1	2
Jam ke-6	20	19.4000	
Hari ke-7	20		51.1500
Jam ke-24	20		52.8000
Sig.		1.000	.746

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 50.750.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

b. Alpha = .05.

## Lampiran C. Gambar Alat dan Bahan Penelitian.

## C.1 Gambar Alat perlakuan hewan coba



- A. Kandang hewan coba.
- B. Neraca Ohaus.
- C. Sonde lambung.
- D. Sarung tangan.
- E. Masker.

### C.2 Gambar Alat untuk Membuat Ekstrak Mimba.



- |                          |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| A. Tabung nitrogen cair. | E. Mesin pengering.     |
| B. Blender.              | F. Alat sentrifuse.     |
| C. Timbangan digital.    | G. Tabung reaksi kecil. |
| D. Baki plastic.         |                         |

### C.3 Gambar Alat untuk Dekaputasi dan Pengambilan Sampel.



- |                            |                    |
|----------------------------|--------------------|
| A. Toples paraffin.        | H. Syringe.        |
| B. Eter.                   | I. Syringe 2.      |
| C. Kapas.                  | J. Masker.         |
| D. Papan paraffin.         | K. Sarung tangan.  |
| E. Pinset sirurgis.        | L. Botol specimen. |
| F. Scalpel dan mata pisau. | M. Obyek glas.     |
| G. Gunting bedah.          |                    |

**C.4 Gambar Perlakuan Hewan Coba.****Gambar 1. Perlakuan Pemberian Ekstrak Alkohol Daun Mimba.****Gambar 2. Perlakuan Induksi Ovalbumin.****C.5 Gambar Pemeriksaan Limfosit.**